Angela Stölzle

ZUR PERCUTANEN RESORPTION DER PROTEINASEINHIBITOREN HIRUDIN, EGLIN UND BDELLIN AUS DEM BLUTEGEL HIRUDO MEDICINALIS

IN VIVO- UND IN VITRO-STUDIEN AM MEERSCHWEINCHEN

Diss. München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0021

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Hans Fritz

ZUR PERCUTANEN RESORPTION DER PROTEINASEINHIBITOREN HIRUDIN, EGLIN UND BDELLIN AUS DEM BLUTEGEL HIRUDO MEDICINALIS

IN VIVO- UND IN VITRO-STUDIEN AM MEERSCHWEINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angela Stölzle

aus
Kempten

Jahr
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: ....Prof. Dr. H. Fritz.....

Mitberichterstatter: .....

Dekan: .....Prof. Dr. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: .20.10.1983.....

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München angefertigt.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung, die mir vielfach mit Rat und Tat zur Seite standen.

Als besonders angenehm empfand ich die Zusammenarbeit mit Uschi Seemüller, die mich unter ihre Fittiche nahm, in die praktische Arbeit mit Proteaseinhibitoren einwies und mir das Hirudin und Eglin b zur Verfügung stellte.

Ganz besonders jedoch danke ich Herrn Fritz, bei dem ich jederzeit ein offenes Ohr fand. Ich schätzte die große Freizügigkeit, die er mir bei der Verwirklichung meiner Ideen kompromißlos zugestand, sowie seine hilfreichen Gespräche, in denen er mich oftmals auch zu abwegig erscheinenden Unternehmungen ermunterte. Seine positive Grundhaltung auch während Zeiten mit keinen oder wenig positiven Ergebnissen motivierte mich während der gesamten Arbeit nachhaltig.

Herrn Dr. Scheuber danke ich für die Einweisung in die immunbiologischen Techniken des DHT und der PCA sowie die Zeit, die er sich für die zahlreichen interessanten Diskussionen nahm. Ihm verdanke ich auch die Fällung der Ig-Rohfraktionen.

Herrn Dr. Thomas Dietl danke ich für die Überlassung der Antiseren vom Kaninchen und die Durchführung der Rocket-Immunelektrophoresen sowie der Radialen Immundiffusionen.

Die histologischen Präparate wurden in den Pathologischen Instituten der Städtischen Krankenhäuser München Harlaching und Schwabing angefertigt. Für die Hilfestellung bei der histologischen Begutachtung danke ich Herrn Dr. Keiditsch.

Bei der druckreifen Fertigstellung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Gerstenberger für das Tippen der Arbeit und bei Frau Wind für die Anfertigung der Tabellen und Abbildungen.

Verzeichnis der Abkürzungen und Begriffserklärungen

ACA	Aktive Cutane Anaphylaxie
ATE	Antithrombin-Einheit
BBI	Bowman-Birk-Inhibitor
DHT	Direkter Hauttest
HAc-P	Essigsäure-Puffer
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LW	Leerwert
MG	Molekulargewicht
mod.S.gr.	modifizierte Salbengrundlage
MW	Mittelwert
NH_4HCO_3-P	Ammoniumbicarbonat-Puffer
NIH-E.	National Institutes of Health, Division of Biologic Standards Einheit
o.S.	ohne Salbe
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCA	Passive Cutane Anaphylaxie
PEG	Polyäthylenglykoll
PK	Prausnitz-Küstner
pNaCl	physiologische Kochsalzlösung (0,15M)
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
PW	Pirbright White
SBTI	Sojabohnen-Trypsininhibitor (Kunitz)
S.gr.	Salbengrundlage
TGP	Tris-Glycin-Puffer
TPZ	Thromboplastinzeit
TRA	Triethanolamin
TRAP	Triethanolamin-Puffer
UPM	Umdrehungen pro Minute
VP	Veronal-Puffer

IU bzw. mIU	Inhibitor-Unit bzw. milli-Inhibitor-Unit
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit

Ala - Alanin	Ile - Isoleucin
Arg - Arginin	Leu - Leucin
Asn - Asparagin	Lys - Lysin
Asp - Asparaginsäure	Pro - Prolin
Asx - Asn oder Asp	Ser - Serin
Cys - Cystein	Thr - Threonin
Gln - Glutamin	Tyr - Tyrosin
Glu - Glutaminsäure	Val - Valin
Gly - Glycin	

$1:5^0$ bzw. 1:1	unverdünnte Ausgangslösung
$1:5^1$, etc.	Verdünnungsschritt der Lösung 1:5, etc.
aktives Serum	normales, nicht erhitztes Serum
hitzeinaktiviertes Serum	durch Erhitzen (30 min, 56°C) behandeltes Serum

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
A.1	Definition: Enzym und Enzym-Inhibitor	2
A.2	Verbreitung der Hirudineen (Blutegel)	2
A.3	Zur Geschichte der Blutegeltherapie	3
A.4	Proteinaseinhibitoren aus Blutegeln	5
A.4.1	Hirudin	6
A.4.2	Egline	9
A.4.3	Bdelline	11
A.4.4	Zur Funktion von Hirudin, Eglinen und Bdellinen beim Blutegel	12
A.5	Aufgabenstellung	15
B	MATERIAL	17
B.1	Versuchstiere	17
B.2	Substanzen	17
B.2.1	Enzyme und Inhibitoren	17
B.2.2	Substrate	18
B.2.3	Reagenzien für die Gerinnungstests	18
B.2.4	Reagenzien für die immunologischen Techniken	19
B.2.5	Materialien für die Säulenchromatographie	19
B.2.6	Materialien für die Immunisierungsversuche	19
B.2.7	Sonstige Materialien	20
B.3	Antiseren	21
B.4	Salben und Blutegelextrakt	22
B.4.1	Zur Definition der Enzym-Hemm-Einheiten	25
B.4.2	Salben	25
B.4.3	Blutegelrohextrakt	26
B.5	Apparaturen	26
B.6	Andere Materialien	27

		Seite
C	METHODEN	29
C.0	Immunologische Grundlagen zu den Testsystemen	29
C.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	36
C.1.1	Schmierversuche beim Meerschweinchen	36
C.1.2	Fütterungsversuche am Meerschweinchen	39
C.1.2.1	Vorversuch	41
C.1.2.2	Verwendete Salben	43
C.1.2.3	Verwendete Lösung	43
C.1.3	Intraperitoneale Immunisierung von Meerschweinchen	43
C.1.4	Der Direkte Hauttest (DHT)	47
C.1.4.1	Prinzip des Tests	47
C.1.4.2	Durchführung der Tests	48
C.1.4.3	Bedeutung des Leerwerts (LW)	49
C.1.4.4	Im DHT getestete Substanzen und Meerschweinchengruppen	50
C.1.5	Nachweis von Meerschweinchen-IgE-Antikörpern durch Passive Cutane Anaphylaxie (PCA)	53
C.1.5.1	Prinzip des Tests	53
C.1.5.2	Durchführung des Tests	54
C.1.5.3	Mit Hilfe der PCA getestete Seren	55
C.2	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	55
C.2.1	Obduktion	55
C.2.2	Histologie	56
C.3	Hämatologische Untersuchungen	56
C.3.1	Gewinnung, Aufbereitung und Aufbewahrung des Blutes	56
C.3.1.1	Meerschweinchen	58
C.3.1.2	Kaninchen	59
C.3.2	Gerinnungsuntersuchungen an Kaninchenplasmen	59
C.3.2.1	Quickwert (Thromboplastinzeit = TPZ)	59
C.3.2.1.1	Prinzip des Tests	59
C.3.2.1.2	Durchführung des Tests	60
C.3.2.2	Partielle Thromboplastinzeit (PTT)	60
C.3.2.2.1	Prinzip des Tests	60
C.3.2.2.2	Durchführung des Tests	61
C.3.3	Herstellung der Ig-Rohfraktion	62
C.3.3.1	Herstellung der Ammoniumsulfatlösung	62
C.3.3.2	Fällung	62
C.4	Urinuntersuchungen	63
C.4.1	Gewinnung, Aufbereitung und Aufbewahrung des Urins	63

		Seite
C.4.2	Dialyse	64
C.4.3	Gelchromatographie	64
C.4.3.1	Sephadex G-10	64
C.4.3.2	Sephadex G-25 fine	65
C.4.4	Enzymhemmtests	65
C.4.4.1	Fibrinogen-Clotting-Test	66
C.4.4.1.1	Prinzip des Tests	66
C.4.4.1.2	Durchführung des Tests	66
C.4.4.1.3	Mit dem Fibrinogen-Clotting-Test untersuchte Urine	67
C.4.4.2	Chromozym TH-Test I	68
C.4.4.2.1	Durchführung des Tests	68
C.4.4.2.2	Stabilität des Thrombins	69
C.4.4.2.3	Stabilität des Hirudins im Urin	69
C.4.4.2.4	Mit dem Chromozym TH-Test I untersuchte Urine	70
C.5	Aktivitätsbestimmung von Hirudinlösungen	70
C.5.1	Fibrinogen-Clotting-Test	71
C.5.2	Chromozym TH-Test I	71
C.5.3	Chromozym TH-Test II	71
C.6	Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II	72
C.6.1	Inkubation von 5 Minuten	74
C.6.2	Inkubation von 1 Stunde	74
C.7	Immundiffusionstechniken	75
C.7.1	Rocket-Immunelektrophorese	75
C.7.1.1	Durchführung	76
C.7.1.2	Eingesetzte Antikörperseren und Urine	77
C.7.2	Radiale Immundiffusion nach Mancini	77
C.7.2.1	Durchführung	78
C.7.2.2	Eingesetzte Antikörperseren und Urine	78
D	ERGEBNISSE	80
D.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	80
D.1.1	Reaktion der Meerschweinchen auf die Schmierungen	80
D.1.1.1	Hautreaktionen	80
D.1.1.2	Gewichtsentwicklung	82
D.1.2	Reaktion der Meerschweinchen auf die Fütterung	84
D.1.3	Reaktion der Meerschweinchen auf die intraperitoneale Immunisierung	85

		Seite
D.1.4	Vergleich der Gewichtsentwicklung bei geschmierten, gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen	86
D.1.5	Der Direkte Hauttest	88
D.1.5.1	Leerwerte	88
D.1.5.2	Geschmierte Meerschweinchen	92
D.1.5.3	Gefütterte Meerschweinchen	96
D.1.5.4	Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen	100
D.1.5.5	Nachweis von freien Blutegelwirkstoffen im Serum geschmierter Meerschweinchen	102
D.1.6	Passive Cutane Anaphylaxie	106
D.1.6.1	Geschmierte Meerschweinchen	106
D.1.6.2	Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen	111
D.1.6.3	Vergleich aller durchgeführten PCA-Reaktionen mit Seren geschmierter und intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen	115
D.2	Pathologisch-morphologische Untersuchungen	119
D.2.1	Obduktion	119
D.2.2	Histologie	120
D.3	Hämatologische Untersuchungen	124
D.3.1	Blutgewinnung	124
D.3.2	Quick-Test	125
D.3.3	Partielle Thromboplastinzeit (PTT)	125
D.3.4	Ig-Rohfraktion	126
D.4	Urinuntersuchungen	127
D.4.1	Dialyse	127
D.4.2	Fibrinogen-Clotting-Test	127
D.4.3	Chromozym TH-Test I	130
D.4.3.1	Stabilität des Thrombins	130
D.4.3.2	Stabilität des Hirudins im Urin	130
D.4.3.3	Getestete Urine	132
D.5	Aktivitätsbestimmungen von Hirudinlösungen	132
D.5.1	Fibrinogen-Clotting-Test	132
D.5.2	Chromozym TH-Test II	135
D.6	Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II	135
D.6.1	Inkubation von 5 Minuten	141
D.6.2	Inkubation von 1 Stunde	143

		Seite
D.6.3	Vergleich der bei der Inkubation über 5 Minuten und 1 Stunde erhaltenen Thrombinaktivitätskurven	143
D.7	Immundiffusionstechniken: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen	145
D.7.1	Rocket-Immunelektrophorese	145
D.7.2	Radiale Immundiffusion nach Mancini	146
E	DISKUSSION	154
E.1	Zu den tierexperimentellen Untersuchungen	154
E.1.1	Hauterscheinungen	154
E.1.2	Gewichtsentwicklung	157
E.1.3	Direkter Hauttest	157
E.1.4	Passive Cutane Anaphylaxie	173
E.2	Zu den pathologisch-morphologischen Untersuchungen	180
E.3	Zu den hämatologischen Untersuchungen	181
E.4	Zu den Urinuntersuchungen	182
E.5	Zu den Aktivitätsbestimmungen von Hirudinlösungen	184
E.6	Zum Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und deren Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II	186
E.7	Zu den Immundiffusionstechniken	191
E.8	Abschließende Diskussion	193
F	ZUSAMMENFASSUNG	197
G	LITERATURVERZEICHNIS	200
	Lebenslauf	214

A EINLEITUNG

Seit dem Beginn des 19. Jahrhunderts galt das Interesse der medizinischen Forschung zunehmend den neuen Grundlagenwissenschaften Mikroskopische Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie. Dabei entwickelte sich die Physiologische Chemie oder Biochemie unter der Führung von Felix Hoppe-Seylers (1825-1895) zu einer gesonderten Disziplin (ACKERKNECHT 1975). Diese somit noch relativ junge Wissenschaft beschäftigt sich mit der Chemie der lebenden Organismen, deren Stoffwechsel in erster Linie von Enzymen gesteuert wird.

Von der Entdeckung des Pepsins durch Schwann im Jahre 1833 bis zur erstmaligen Reindarstellung der Urease durch Sumner 1926 war ein weiter Weg (KARLSON 1974). Erst seit etwa der Mitte dieses Jahrhunderts hat die Enzymologie in immer größerem Maße Eingang in die praktische Medizin gefunden, sowohl in die Diagnostik als auch in die Therapie.

Proteolytische Enzyme und deren natürliche Inhibitoren findet man ubiquitär in der Natur: in Pflanzen, Tieren und beim Menschen (VOGEL et al. 1968). Sie sind beteiligt an der Verdauung von Nahrungsmittelproteinen, an der Mobilisierung von Gewebsproteinen, der Aktivierung von Proenzymen, der Steuerung von Blutgerinnung und Fibrinolyse, sowie an Entzündungsvorgängen, immunbiologischen Prozessen und am Fortpflanzungsgeschehen (HABERMANN 1971, PFLEIDERER und ZWILLING 1972, WERLE und ZICKGRAF-RÜDEL 1972, FRITZ et al. 1974, NEWBALL et al. 1975, REICH et al. 1975, SCHILL 1975, 1976).

Chemisch gehören alle bisher bekannten Enzyme und Enzyminhibitoren zur Stoffklasse der Proteine oder Proteide.

A.1 Definition: Enzym und Enzym-Inhibitor

Enzyme sind Proteine mit spezifischen katalytischen Funktionen. Als Katalysatoren wirken sie in kleinsten Mengen, gehen aus der Reaktion unverändert hervor und haben innerhalb weiter Aktivitätsgrenzen keinen Einfluß auf die Lage des Reaktionsgleichgewichts, sie beschleunigen lediglich dessen Einstellung (MATTENHEIMER 1973).
Früher wurde angenommen, daß sich diese katalytische Wirkung nur auf die intakte Zelle beschränkt. Heute weiß man, daß es möglich ist, viele Enzyme ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität aus der Zelle zu extrahieren. Man kann sie somit getrennt von der lebenden Zelle untersuchen. Gerade in Zellextrakten können Stoffwechselreaktionen und ihre Regulation studiert werden (HARPER et al. 1975).

Protein-Proteinase-Inhibitoren werden als Proteine oder Proteide definiert, die mit einer oder mehreren Proteinase(n) im stöchiometrischen Verhältnis zumeist reversible Komplexe bilden, in denen alle katalytischen Funktionen der betreffenden Enzyme gehemmt sind (LASKOWSKI jr. und SEALOCK 1971). Diese Definition trifft für die niedermolekularen mikrobiellen sowie für die meisten pflanzlichen und tierischen Inhibitoren mit Molekulargewichten bis ca. 50 000 Dalton zu.

A.2 Verbreitung der Hirudineen (Blutegel)

Hirudineen sind in allen Erdteilen und Meeren mit Ausnahme einiger Inseln im Stillen Ozean bekannt. Nur in trockenen Wüsten, ständig vergletschertem Hochgebirge, in Polnähe und in stark salzhaltigen Gewässern können sie sich nicht adaptieren. Von den etwa 300 bekannten Egelarten leben über 200

im Süßwasser, etwa 60 im Meer und ca. 30 in feuchter Umgebung auf dem Lande. In vertikaler Richtung erstreckt sich ihre Verbreitung über mindestens 4 600 m. Sie wurden im Meer in 800 m Tiefe und in den südamerikanischen Kordilleren in 3 800 m Höhe gefunden. In horizontaler Richtung haben sie sich von der Arktis bis in die Antarktis verbreitet. Als nördlichster Fundort gilt Spitzbergen, als südlichster der 70. Breitengrad (HERTER 1968, MANN 1962).

A.3 Zur Geschichte der Blutegeltherapie

Seit Jahrtausenden werden bei den verschiedenen Völkern blutsaugende Egel in der Heilkunde gebraucht. Der Zeitpunkt, da man erkannte, daß nicht nur der Blutentzug, sondern auch der Speichel der Egel, der in den Körper gelangt, bei vielen Erkrankungen wohltuend wirkt, läßt sich nicht mehr feststellen (HERTER 1968).

Bereits im alten Ägypten war die Heilbehandlung mit Blutegeln bekannt, was aus medizinischen Papyri aus dem 17. und 18. Jh. v. Chr. hervorgeht (LYONS und PETRUCELLI II 1980). In Indien wurden Blutegel schon vor den Sanskrit-Schriftstellern (ca. 10. Jh. v. Chr.) empfohlen und seit dem 5. Jh. v. Chr. auch gezüchtet. Die Juden des Alten Testaments tranken Wein, in den getrocknete Blutegel gelegt worden waren, als Mittel gegen Milzschwellung.

Der erste Name, der im Zusammenhang mit der Blutegeltherapie auftaucht, lautet Nicandros von Colophon - Arzt, Dichter und Priester aus Kleinasien (200 bis 130 v. Chr.). Als eigentlicher Begründer der abendländischen Blutegeltherapie gilt Thanison von Laodica (1. Jh. v. Chr). Von da an wird sie in den Schriften von Galen (130 bis 201), Oreibacios (ca. 360),

Antyllos (= Plinius der Ältere, 23 oder 24 bis 79), Avicenna (980-1037), El Cazwini (1203-1283) und anderer angeführt. Sie wird Bestandteil des Heilschatzes der alten Ärzte (STRÜMPER 1963, HERTER 1968).

Im Mittelalter waren Blutegel so sehr Allgemeingut der Medizin geworden, daß kaum ein Arzt auf diese wertvollen Helfer verzichten wollte. Bemerkenswert ist, daß das Indikationsverzeichnis für die Egeltherapie von der vorchristlichen Zeit über das Mittelalter bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts in etwa gleich geblieben ist: Zahngeschwulst, Kopfschmerzen, Halsentzündung, Diphtherie, Entzündungen aller Art, Keuchhusten, Nagelgeschwüre, Regelverhaltungen, Hämorrhoiden, anhaltendes Fieber und Gallenkoliken (JOHNSON 1816).

Allerdings werden in den folgenden Jahrhunderten die Blutegel zur Bekämpfung fast aller Krankheiten und Leiden benutzt. Die Beliebtheit der Blutegel nahm vom Ende des 18. Jh. an bei Ärzten und Laien laufend zu und artete zur Mode aus. Namen für die Behandlung wie "Vampyrismus" oder "Broussaisismus" stehen stellvertretend für diese Zeit. Diesen Richtungen zufolge sollte jedes Leiden, von Infektionen über endokrinologische Erkrankungen bis zu Geisteskrankheiten, durch die Egeltherapie zu heilen sein.

Der Egelverbrauch der Berliner Charité stieg von 120 Egeln im Jahr 1811 auf 16 660 Tiere im Jahre 1813. Um 1860 soll der Verbrauch an Blutegeln je Jahr in Deutschland etwa 25 Millionen Stück betragen haben. Ein noch größerer Bedarf lag in Frankreich vor. Für die Zeit zwischen 1837 und 1844 wird er auf jährlich 30 Millionen geschätzt. Seinen Höhepunkt für medizinische Zwecke hatte der Egelverbrauch zwischen 1820 und 1850. Von da an vollzog sich ein zunächst langsamer, später beschleunigter Rückgang. Immerhin soll im Jahr 1904 die Blutegeleinfuhr nach England und Frankreich noch je 16 Millionen, nach Deutschland sogar noch 25 Millionen betragen haben (STRÜMPER 1963, HERTER 1968).

Durch das Aufkommen von Asepsis/Antisepsis und die zunehmende Kenntnis der Infektionserreger erfolgte die Abkehr von der Blutegelbehandlung ziemlich plötzlich, da der Blutegel weder aseptisch zu halten noch steril anzuwenden war.
So schreibt BOTTENBERG (1935): "Wir haben hier die überaus interessante medizingeschichtliche Tatsache, daß ein großer Teil wertvollen Heilgutes aus der offiziellen Medizin verschwindet und in die Praxis der Bader, Kräuterweiber, Kurpfuscher, Naturärzte et hoc genus omne abwandert. Dort fristet er jahrzehntelang ein, wie wir in letzter Zeit erkennen mußten, nicht wirkungsloses Dasein".
In Frankreich haben sich Ärzte seit etwa 1920 erneut mit der Blutegeltherapie und -prophylaxe beschäftigt, namentlich im Zusammenhang mit Thrombosen und Embolien (HERTER 1968, STRÜMPER 1963). BOTTENBERG (1935) war es auch, der in Deutschland die Blutegelapplikation wieder propagierte. Diese darf jedoch heute zu einer Außenseitermethode der modernen Medizin gerechnet werden.

Ganz anders steht es um die Anwendung von Salben, die Blutegelextrakte enthalten. Diese Behandlungsart hat weitgehend Eingang in Klinik und Praxis gefunden mit durchaus positiven Erfolgen (BOTTENBERG 1935, BRANDIS F. und ROTHE 1957, DEUSER 1971, GOLLNICK 1963, KÖSTERING et al. 1973, MITTELSTAEDT 1973, RINGSHAUSEN 1963, STOCK et al. 1979, WESENER 1965, 1967, ZETTEL 1967). Jedoch steht der eindeutige Nachweis der perkutanen Resorption der Blutegelwirkstoffe aus den applizierten Salben immer noch aus.

A.4 Proteinaseinhibitoren aus Blutegeln

Die Geschichte der Isolierung von Proteinaseinhibitoren aus Blutegeln beginnt im Jahre 1884, als HAYCRAFT (1884) als er-

ster einen gerinnungshemmenden Extrakt aus den Köpfen von Hirudineen gewinnen konnte. JAKOBJ (1904), Ordinarius für Pharmakologie der Universität Göttingen, gab diesem Wirkstoff den Nahmen Hirudin. 1955 gelang es MARKWARDT, reines Hirudin zu isolieren (MARKWARDT 1955, 1963).

Bis heute sind folgende Proteinaseinhibitoren aus Blutegeln isoliert und zum Teil charakterisiert:
- das Hirudin (Thrombininhibitor),
- die Isoinhibitoren Eglin b und Eglin c (Chymotrypsin-, Leukozytenelastase- und Kathepsin G-Inhibitoren (SEEMÜLLER et al. 1977a, b)),
- die Bdelline mit den immunologisch verwandten Isomeren Bdellin A und Bdellin B (Trypsin-, Plasmin- und Akrosin-Inhibitoren (FRITZ et al. 1971)).

A.4.1 Hirudin

Dieses Protein greift als Thrombininhibitor in die Blutgerinnung ein (MARKWARDT 1956, MARKWARDT und WALSMANN 1958). Soweit bis heute bekannt, besteht das Hirudinmolekül aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 7 400 (PETERSEN et al. 1976). Hirudin besitzt einen niedrigen isoelektrischen Punkt (ca. 3,8 - 4,0), was auf einen hohen Gehalt an Glutamin- und Asparaginsäure zurückzuführen ist. Seine vorläufige, partielle Primärstruktur zeigt Abbildung 1.
Die endgültige Klärung seiner Aminosäurenzusammensetzung und Primärstruktur ist in Vorbereitung (DODT et al.: in Vorbereitung).

Hirudin hemmt Thrombin spezifisch. Thrombin (Gerinnungsfaktor IIa), das im strömenden Blut normalerweise als Prothrombin (Faktor II) vorliegt, katalysiert den letzten Schritt der Gerinnungskaskade, indem es vom Fibrinogenmolekül die sogenannten Fibrinopeptide A und B abspaltet. Nach der Fibrinpolymeri-

1 10
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-

20 30
Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-

40 50
Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln,(Ser,His,Asx,Asx,Asx,

60 SO_3^-
Gly)-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu,Tyr-Leu-Gln

Abb. 1 Sequenz von Hirudin (PETERSEN et al. 1976)

sation, die keiner enzymatischen Aktivierung bedarf, erfolgt die Stabilisierung des Fibrinnetzes, die durch den fibrinstabilisierenden Faktor (Faktor XIIIa) gesteuert wird. Faktor XIII wird in Anwesenheit von Kalziumionen ebenfalls von Thrombin zu Faktor XIIIa aktiviert (Abb. 2).

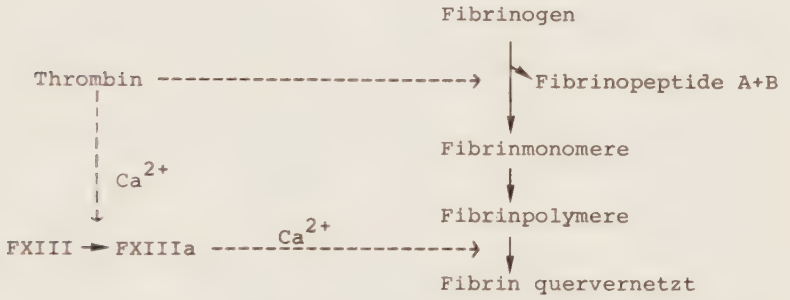


Abb. 2 Schematischer Ablauf der Fibrinbildung durch Thrombin (nach BARTHELS und POLIWODA 1980)

Im menschlichen Organismus ist das Antithrombin III der potenteste Hemmstoff des Thrombins. Dabei ist besonders bemerkenswert, daß das Antithrombin III, ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht um 70 000, in vivo nur mit einer erheblichen zeitlichen Verzögerung wirksam wird (SCHRAMM 1981). Die relativ langsame, sog. Progressivhemmung ist dadurch bedingt, daß das Antithrombin III-Molekül erst nach einer Konformationsänderung seine Hemmaktivität gegen Thrombin und Faktor Xa voll entfalten kann. Die Konformationsänderung wird auch durch Heparin induziert, das auf diese Weise die Reaktion des Antithrombin III mit Thrombin bzw. Faktor Xa um das 200-400fache beschleunigt. Heparin ist somit nur in Verbindung mit diesem Inhibitor als Kofaktor des Antithrombin III wirksam, d.h., das bei der Heparintherapie eigentlich wirksame Agens stellt ein Heparin-Antithrombin III-Addukt dar. Die Heparinwirkung auf die Blutgerinnun ist demnach an das Vorhandensein von genügend Antithrombin III gebunden (MARX 1981).

Hirudin hat gegenüber Heparin den Vorzug, auch bei Antithrombin III-Mangel (primär oder sekundär bedingt, z.B. angeborener Mangel oder bei Verbrauchskoagulopathie) wirksam zu sein. Aufgrund seiner Spezifität gegenüber Thrombin ist es als mögliches Pharmakon bei Hyperkoagulabilität indiziert. Es bewirkt nicht nur eine signifikante Verzögerung der partiellen Thromboplastinzeit, sondern auch der nativen venösen Blutgerinnungszeit. Dies ist zum größten Teil auf die direkte Hemmwirkung gegenüber dem freien Thrombin zurückzuführen, zu einem kleineren Teil aber auch auf die Komplexbildung des Hirudins mit dem Vorläufer des α-Thrombins, dem Prothrombin E oder Neothrombin T. Dies bedeutet, daß die Faktor Xa-induzierte Bildung des α-Thrombins durch Hirudin ebenfalls gehemmt wird (SCHRAMM et al. 1977).
Neuere Untersuchungen von DAVIE et al. (1979) weisen auch auf eine Hemmaktivität des Hirudins gegenüber Faktor IXa hin. Darüberhinaus soll das Hirudin auch eine Lymphstrom-beschleunigende Wirkung besitzen (HEIDENHAIN 1891).

Zusätzlich bewirkt Hirudin eine Hemmung der Thrombozytenaggregation (MARKWARDT 1963), sofern letztere durch Thrombin ausgelöst wird.

A.4.2 Egline

Die Serinproteinase-Inhibitoren Eglin b und Eglin c wurden von SEEMÜLLER (1979) isoliert und charakterisiert. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 8 073 bzw. 8 099 und bestehen aus 70 Aminosäuren. Die Egline enthalten weder Cystin noch Cystein. Die beiden Isoinhibitoren unterscheiden sich voneinander in ihrer elektrophoretischen Mobilität und dem isoelektrischen Punkt. Dieser liegt für Eglin b bei pH 6,6 und für Eglin c bei pH 6,45. Die Primärstruktur von Eglin c wurde aufgeklärt (Abb.3). Das Hemmspektrum der Egline umfaßt die Proteinasen Chymotrypsin,

```
1                                   10
Thr-Glu-Phe-Gly-Ser-Glu-Leu-Lys-Ser-Phe-Pro-Glu-Val-Val-Gly-Lys-Thr-Val-

      20                                                  30
Asn-Gln-Ala-Arg-Glu-Tyr-Phe-Thr-Leu-His-Tyr-Pro-Gln-Tyr-Asn-Val-Tyr-Phe-

            40                                                  50
Leu-Pro-Glu-Gly-Ser-Pro-Val-Thr-Leu-Asp-Leu-Arg-Tyr-Asn-Arg-Val-Arg-Val-

                        60                                          70
Phe-Tyr-Asn-Pro-Gly-Thr-Asn-Val-Val-Asn-His-Val-Pro-His-Val-Gly
```

Abb. 3 Sequenz von Eglin c (SEEMÜLLER 1979)

Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Trypsin und Pankreas-Elastase werden nur schwach gehemmt.

Die Hemmwirkung der Egline gegenüber den granulozytären Proteinasen Elastase und Kathepsin G ist von besonderem medizinischen Interesse. Die Freisetzung dieser Enzyme aus den Leukozytengranula erfolgt nach Stimulation durch Bakterien bzw. Bakterienprodukte (z.B. Endotoxine), Immunkomplexe, Kristalle (z.B. Harnstoff) oder andere membranaktive Substanzen. Die Aktivität des freigesetzten Enzympotentials wird normalerweise durch die natürlichen Inhibitoren α_1-Antitrypsin (Elastase), α_2-Makroglobulin (Elastase und Kathepsin G) und α_1-Antichymotrypsin (Kathepsin G) neutralisiert. Wenn die Hemmkapazität dieser Inhibitoren im Verlaufe von Entzündungsreaktionen nicht mehr ausreicht - im Extremfall kann z.B. bis zu 1 g Elastase pro Tag freigesetzt werden (LAURELL 1975) - kommt es zu schweren Gewebsschäden, so z.B. zu Lungenemphysem, Glomerulonephritis sowie rheumatischen und arthritischen Erkrankungen (MORSE 1978a,b).

Vor diesem Hintergrund gewinnen Inhibitoren mit der Hemmspezifität und dem niedrigen Molekulargewicht der Egline besonderes medizinisches Interesse, was einen therapeutischen Einsatz betrifft. Erste Schritte in diese Richtung sind tierexperimentell bereits unternommen worden (WITTE 1979).

A.4.3 Bdelline

Von FRITZ und Mitarbeitern (1971) wurden als weitere Gruppe von Protein-Proteinase-Inhibitoren die Bdelline aus dem Blutegel isoliert. Es handelt sich hierbei um zwei Typen von

Trypsin-Plasmin-Akrosin-Inhibitoren, dem sog. Bdellin A und Bdellin B (SCHRAMM et al. 1977). Bdellin A hemmt besonders stark das Humanplasmin, Bdellin B das Akrosin. Akrosin wird als eines der Schlüsselenzyme beim Befruchtungsvorgang angesehen. Das Vorkommen dieses Inhibitors beim Blutegel wird im Zusammenhang mit dessen Zwitterdasein diskutiert.

Bei beiden Bdellintypen findet man multiple Inhibitorformen. Die Bdelline A besitzen Molekulargewichte zwischen 6 000 - 6 300, die Bdelline B um 5 000 Dalton. Die Anzahl der Aminosäuren variiert je nach Inhibitorform bei Bdellin A von 56 bis 59. Bdellin B-3, dessen Struktur von KREJCI und FRITZ (1976) teilweise aufgeklärt wurde, besitzt 45 Aminosäuren (Abb.4).

Ein möglicher medizinisch-therapeutischer Einsatz des Bdellin A hinsichtlich seiner Funktion als Plasmininhibitor ist noch Gegenstand der Forschung.

Eine Zusammenstellung der bekannten Daten von Blutegel-Inhibitoren findet sich in Tabelle 1.

A.4.4 Zur Funktion von Hirudin, Eglinen und Bdellinen beim Blutegel

Die Funktion des Hirudins wird in seiner spezifischen Thrombinhemmung gesehen. Während des Saugaktes am Wirtstier gelangt der hirudinhaltige Speichel in das Wirtsblut, wodurch dessen Gerinnung verhindert wird. Gleichzeitig schluckt der Egel sein Hirudin zusammen mit dem Blut. Dieses gerinnungshemmende Prinzip ist für den Egel lebensnotwendig, da im anderen Fall das geronnene Blut seinen Gastrointestinaltrakt blockieren und der Egel eingehen würde.

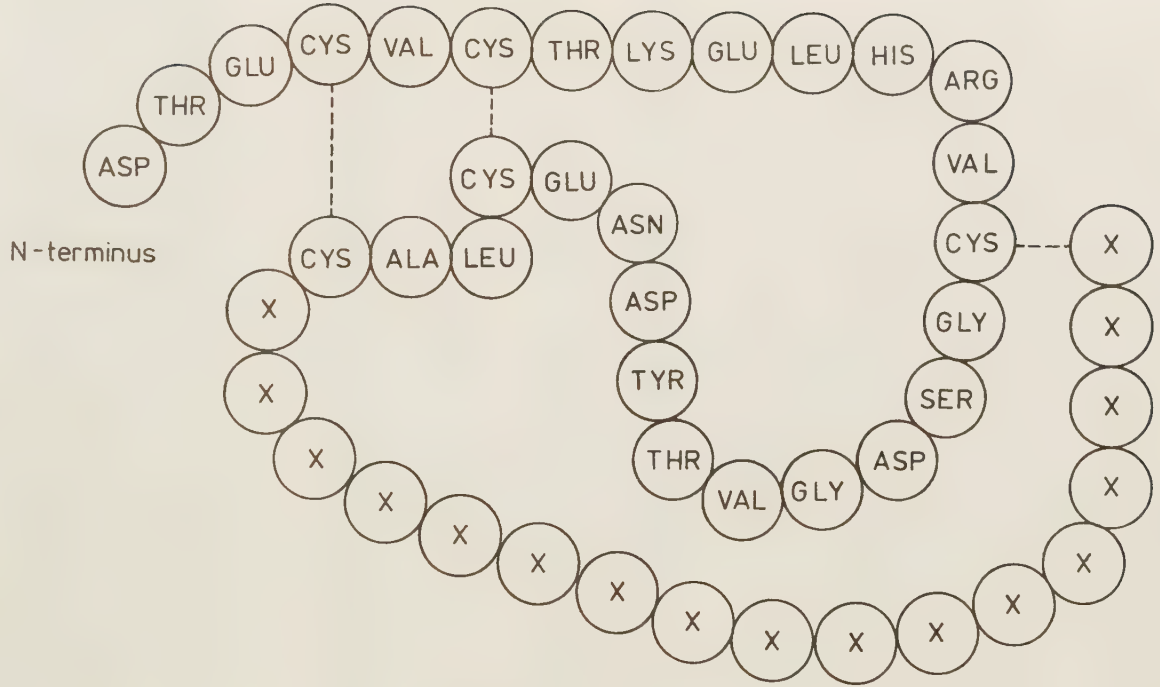


Abb. 4 Bis heute bekannte Sequenz und Struktur von Bdellin B-3 (modifiziert nach KREJCI und FRITZ 1976). Unterbrochene gerade Linien: hypothetische Cystin-Brücken im Bdellin B-3 Molekül. Mit X bezeichnete Kreise: unbekannte Aminosäuren.

Tabelle 1 Bekannte Daten von Blutegel-Inhibitoren

[1]aus menschlichen Granulozyten; [2]Pankreaselastase; [3]Plasmin vom Schwein; [4]Plasmin vom Menschen

	Hirudin	Egline		Bdelline	
		Eglin b	Eglin c	Bdelline A	Bdelline B
Mol.-Gewicht	ca. 7 400	8 073	8 099	6 000-6 300	ca. 5 000
Anzahl AS[a]	ca. 65	70	70	56-59	45
Primärstruktur	z.T. bekannt	bekannt	bekannt	unbekannt	z.T. bekannt (B-3)
Isoel. Punkt	pH 3,8-4,0	pH 6,6	pH 6,45		
Hemmspektrum	Thrombin Faktor IXa ?	Chymotrypsin Subtilisin Elastase[1] Kathepsin G[1] Trypsin Elastase[2]		Trypsin Plasmin[3] Plasmin[4] Akrosin	

AS[a], Aminosäuren

Die Funktion der Egline ist noch völlig offen. Da Aussagen über Bildungs- und Wirkungsort dieser Inhibitoren noch nicht gemacht werden können, gibt es auch keine Hinweise, ob den Eglinen eine Rolle bei der Blutaufnahme zukommt oder ob sie andere physiologische Aufgaben erfüllen.
Die Funktion der Bdelline ist ebenfalls unklar. Die mögliche Bedeutung des Bdellin B-3 bezüglich seiner Hemmwirkung gegen Akrosin wurde bereits angesprochen. Da der Blutegel von seinem anatomischen Aufbau her mehrere Bauchhodenpaare besitzt, ist es möglich, daß die Bdelline eine Schutzfunktion vor proteolytischem Abbau durch Akrosin bei dessen Freisetzung aus absterbenden Spermien übernehmen.

A.5 Aufgabenstellung

Ausgangspunkt war die Tatsache, daß hirudinhaltige Salben vielfach in Klinik und medizinischer Praxis z.B. bei der Behandlung von Hämatomen sowie nach Gelenkoperationen äußerlich angewandt werden. Es existieren auch Studien über deren Wirksamkeit (STOCK et al. 1979, KÖSTERING et al. 1973). Der direkte Resorptionsnachweis von Blutegelwirkstoffen durch die Haut wurde aber bisher nicht erbracht.
Die hier vorgelegte Arbeit hatte das Ziel, am Tiermodell den Nachweis der Resorption von Blutegelinhaltsstoffen aus Salben durch die intakte Haut zu erbringen.

Das Problem des einwandfreien Nachweises der Resorption von Wirkstoffen des Blutegels (z.B. des Hirudins) durch die Haut ist in erster Linie ein Mengenproblem. Da im Reagenzglas noch 0,1 ATE (d.s. 10 ng) pro ml gerinnungshemmend wirksam sind, muß man zur Nachweisbarkeit in vivo picogramm-Mengen einwandfrei identifizieren können.

Bei allen bisherigen Studien dieser Art (z.B. auch beim Heparin) wird z.B. nur der Übertritt der Radioaktivität entsprechend markierter Moleküle in Serum, Harn, etc. gemessen. Das ist jedoch insofern irreführend, da die Moleküle z.T. schon beim Durchtritt durch die Haut verstoffwechselt werden können und somit oft nur biologisch inaktive Spaltprodukte in Serum und Harn auftreten.

Unser Bestreben war es, die positiven klinischen Befunde bei Verwendung von Blutegelinhaltsstoffen enthaltenden Salben durch einen Resorptionsnachweis zu untermauern, bei dem mittels biochemischer und immunologisch/biologischer Methoden der Erhalt der biologischen Aktivität des resorbierten Moleküls einwandfrei belegbar ist.

In erster Linie wurde dabei das Hirudin eingesetzt. Einige als Pilotversuche zu wertende Versuche mit Eglin b und Bdellin B wurden ebenfalls durchgeführt.

B MATERIAL

B.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an folgenden Versuchstieren durchgeführt:

- Meerschweinchen
  Inzuchtstamm 13N, männliche Tiere, 500-900 g
  Inzuchtstamm 2N, männliche und weibliche Tiere, 500-800 g
  Auszuchtstamm Pirbright White, männliche und weibliche Tiere, 500-800 g

Für die Vorversuche wurden zusätzlich verwendet:

- Kaninchen, Deutscher Riese, Auszuchtstamm, männliche und weibliche Tiere, 4,1-4,7 kg
- Ratten, Wistar, Auszuchtstamm, weibliche Tiere, 250-350 g

Die Versuchstiere wurden in einem offenen System unter klimatisierten Bedingungen (20°C $\pm$ 1°C, relative Luftfeuchte 55 % $\pm$ 5 %) und Gewährleistung hygienischer Maßnahmen gehalten. Sie erhielten pelletiertes Fertigfutter (Fa. Altrumin, Lage Westfalen) und Trinkwasser ad libitum.
Alle Tiere wurden im hauseigenen Tierlabor gezüchtet und aufgezogen.

B.2 Substanzen

B.2.1 Enzyme und Inhibitoren

- Thrombin: Test-Thrombin vom Rind, 30 IU/ml, Behringwerke, Marburg

- Sojabohnen-Trypsininhibitor (SBTI): 10 BAEE units/mg (Art. T-9 003), Sigma, St. Louis, USA
- Hirudin: verschiedene Chargen mit Aktivitäten von 6 000 - 8 000 ATE/mg (höchstmögliche Aktivität 10 400 ATE/mg, MARKWARDT und WALSMANN 1967), freundlicherweise von Frau Dr. Seemüller bzw. von der Firma Plantorgan überlassen Reinheitskriterien: Molekulargewichtsbestimmung, Aminosäurenanalyse, Endgruppenbestimmung, spezifische Aktivität
- Eglin b: Charge mit einer Aktivität von 70 mIU/mg (höchstmöglicher Wert 140 mIU/mg, Darstellung nach SEEMÜLLER et al. 1977b), freundlicherweise von Frau Dr. Seemüller überlassen
- Bdellin B: Charge eines hochmolekularen Präparates mit einer Aktivität von 1,3 IU/mg (höchstmöglicher Wert 4,8 IU/mg, FRITZ et al. 1971), MG ca. 20 000 (bestimmt über SDS-Gele), entspricht Bdellin B + Proteinrest, freundlicherweise von Frau H. Rehm überlassen
- Bowman-Birk-Inhibitor (BBI): Charge mit einer Aktivität von 2,5 IU/mg (höchstmögliche Aktivität 3 IU/mg), freundlicherweise von Frau Dr. Jochum überlassen

B.2.2 Substrate

- Chromozym TH: chromogenes Substrat für Thrombin (Art. 199 664), Boehringer, Mannheim
- Fibrinogen: Test-Fibrinogen vom Rind, Behringwerke, Marburg

B.2.3 Reagenzien für die Gerinnungstests

- Pathromtin: Reagenz zur Bestimmung der PTT, Behringwerke, Marburg
- Thromborel: Ca-haltiges Human-Thromboplastin zur Bestimmung der TPZ, Behringwerke, Marburg

- Kontroll-Plasma N (human): zur Richtigkeitskontrolle im Normalbereich, Behringwerke, Marburg
- Ci-trol-1: Kontrollplasma im Normalbereich (Art. 291 070), Merz+Dade, München
- Ci-trol-2: Kontrollplasma im pathologischen Bereich (Art. 291 070), Merz+Dade, München
- Calcium Chloride: (Art. 281 004), Merz+Dade, München
- Ampuwa: steriles aqua bidest. (Art. 057 5621/1), Fresenius, Bad Homburg
- Isotonische Kochsalzlösung: 0,9 %-ig, Fresenius, Bad Homburg

B.2.4 Reagenzien für die immunologischen Techniken

- Agarose: A37, Indubiose, Réactifs IBF, Clichy, Frankreich
- Polyäthylenglykoll (PEG): Type 6 000 (Art. 33 137), Serva, Heidelberg
- Coomassie Brillant Blue R-250: (Art. 17 525), Serva, Heidelberg

B.2.5 Materialien für die Säulenchromatographie

- Sephadex G-10: (Art. 2 102), Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Sephadex G-25 fine: (Art. 2 124), Pharmacia, Uppsala, Schweden

B.2.6 Materialien für die Immunisierungsversuche

- Alu Gel S: Aluminium Hydroxidgel (Art. 12 261), Serva, Heidelberg

- Endoxan: Cyclophosphamid, Asta-Werke, Bielefeld

B.2.7 Sonstige Materialien

- Chloräthyl Dr. Henning: Aether chloratus - Spray, Chem. Fabrik Dr. Henning, Walldorf Baden
- Evans Blau: (Art. 3 169), Merck, Darmstadt
  Evans Blau - Lösung: 1-%ig gelöst in 0,15 M Kochsalzlösung
- Kodan-Tinktur: farblos, Schülke und Mayr, Norderstedt
- Natriumcitratlösung; Fresenius, Bad Homburg
- T61: Injektionslösung zur excitationslösen Tötung, Hoechst, Frankfurt
- Triethanolamin (TRA): (Art. 8 379), Merck, Darmstadt
- Triton X-100: nicht ionisches Detergens (Art. 37 240), Serva, Heidelberg

Puffer:

- HAc-P: Essigsäure-Puffer
  0,1 M HAc
  es stellt sich ein pH von 2-3 ein
- PBS I: Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung I
  0,15 M NaCl
  0,007 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
  0,003 M KH_2PO_4
  0,002 M NaN_3
  es stellt sich ein pH von 7,2 ein
- PBS II: Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung II
  0,14 M NaCl
  0,01 M Phosphatpuffer
  mit 1 N Natronlauge auf pH 6,8-7,2 eingestellt
- Phosphat-Puffer: 0,25 M Na_3PO_4
  aqua dest. ad 1 000 ml
  auf pH 6,5 eingestellt
- Quiep: 0,08 M Tris
  0,024 M Tricine

0,003 M Ca-Lactat
0,02 M Naazid
mit konz. HCl auf pH 8,6 eingestellt

- TGP: Tris-Glycin-Puffer (nach PORATH und UI 1964)
0,2 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,5 M Glycin
0,02 % Naazid
mit konz. HCl auf pH 7,6 eingestellt

- TRAP I: Triethanolamin-Puffer I
0,1 M TRA
0,2 M NaCl
aqua dest. ad 1 000 ml
mit 2 N HCl auf pH 8,4 eingestellt

- TRAP II: Triethanolamin-Puffer II
wie TRAP I
+ 0,05 % Triton X-100

- VP: Veronal-Puffer (nach MICHAELIS)
20,62 g Veronalnatrium
aqua dest. ad 1 000 ml
mit 0,1 N HCl auf pH 7 eingestellt

Alle übrigen Substanzen waren vom höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

B.3 Antiseren

Folgende Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Dietl zur Verfügung gestellt:

IgG-Antikörper von immunisierten Kaninchen (Deutscher Riese):

Hirudin-Antikörper
Eglin-Antikörper
Blutegelrohextrakt-Antikörper

Die zur Immunisierung verwendeten Hirudin- (spezifische Aktivität: 8 000 ATE/mg) und Eglin-Antigene (spezifische Aktivität: 140 mIU/mg) waren von höchstmöglicher Hemmaktivität und analytisch rein. Beim Blutegelrohextrakt handelte es sich um ein polyvalentes Antigen (Hirudinaktivität: 100 ATE/mg).

Das Antihirudinserum zeigte in der Immunelektrophorese gegen Rohextrakt eine Bande und gegen reines Hirudin eine Doppelbande (s. Abb. B.3-1) mit gleichen Laufstrecken der Bandenmittelpunkte.

Die Hirudinspezifität wurde im Thrombin-Hirudin-Hemmtest (s. Abschnitt C.5.3) belegt (s. Abb. B.3-2). Aus einer Antiserumverdünnungsreihe konnte die einer Hirudinmenge äquivalente Antiserummenge bestimmt werden. Dabei konnte 1 ml Antiserum 200 mIU (6 600 ATE) Hirudin inaktivieren.

Die Eglin-Antikörper bestanden aus einer monospezifischen IgG-Fraktion, die immunelektrophoretisch allein und im Komplex mit Chymotrypsin jeweils nur eine Bande ergab (s. Abb. B.3-3).

Aus der Bestimmung freien Antigens nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen Antiserums wurde mittels der Rocket-Immunelektrophorese der Serumtiter festgelegt. Dabei banden 60 mg IgG-Antikörper 1 mg Eglin.

Für die jeweiligen Antikörper (anti-Hirudin, anti-Eglin) wurden eventuelle Kreuzreaktionen mit allen zur Verfügung stehenden Inhibitorantigenen des Blutegels ausgeschlossen.
(Sämtliche Angaben, DIETL et al.: in Vorbereitung).

B.4 Salben und Blutegelextrakt

Für die Versuche wurden von der Fa. Plantorgan, Bad Zwischenahn, "Blutegelsalben" und vorgereinigter Blutegelrohextrakt zur Verfügung gestellt (s. Abschnitt B.4.2 und B.4.3).

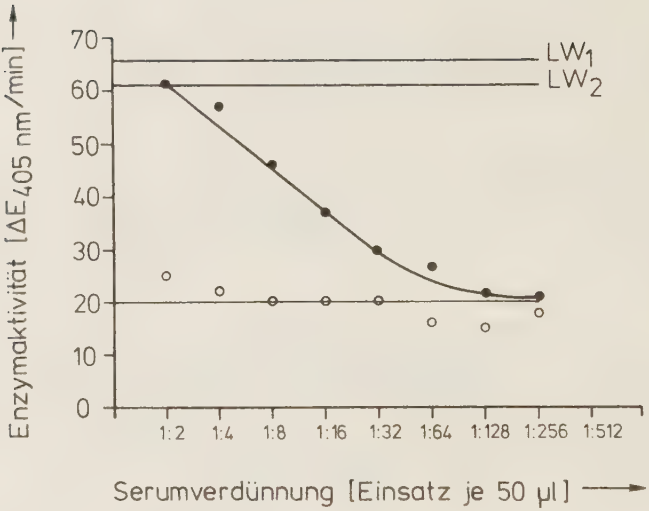


Abb. B3-2 Thrombin-Hirudin-Hemmtest: Beeinflußung der Thrombinaktivität durch freies Hirudin nach Vorinkubation von 5 mIU Hirudin mit je 50 µl verdünntem Antiserum vom Kaninchen (2er-Schritt-Verdünnungsreihe)

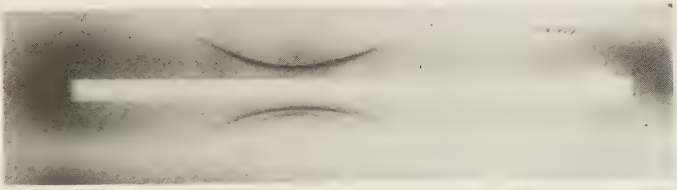
• Antiserum

o Nullserum

LW_1, maximaler Thrombinleerwert

LW_2, minimaler Thrombinleerwert

Blutegelrohextrakt
unverdünnt

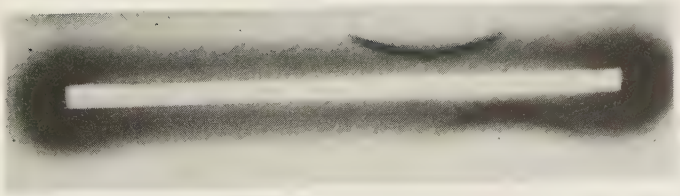


Antiserum vom
Kaninchen

reines Hirudin unverdünnt
(8 000 ATE/mg)

Abb. B3-1 Immunelektrophorese von Blutegelrohextrakt und reinem Hirudin diffundiert gegen Anti-Hirudinserum

Eglin unverdünnt
(140 mIU/mg)



Antiserum vom
Kaninchen

Eglin im Komplex
mit Chymotrypsin

Abb. B3-3 Immunelektrophorese von Eglin und Eglin im Komplex mit Chymotrypsin diffundiert gegen Anti-Eglinserum

B.4.1 Zur Definition der Enzym-Hemm-Einheiten

Die Aktivität von Thrombin wird allgemein in NIH-Einheiten angegeben. Eine NIH-E. ist gemäß der Definition des amerikanischen National Institutes of Health (Division of Biologic Standards) diejenige Menge Thrombin, welche 1 ml einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 sec bei 28°C zu koagulieren vermag (MARKWARDT 1963).
1 U (Internationale Einheit) Thrombin entspricht 2 NIH-E.

Thrombin wird von Hirudin in stöchiometrischem Verhältnis gehemmt (ein Molekül Hirudin reagiert dabei stets nur mit einem Molekül Thrombin), so daß eine bestimmte Menge Hemmstoff stets eine äquivalente Menge Thrombin blockiert. Die Aktivität von Hirudin kann demnach in Antithrombin-Einheiten (ATE) angegeben werden, wobei eine ATE derjenigen Menge Hirudin entspricht, die eine NIH-E. Thrombin hemmt (MARKWARDT 1963). Bei Angabe der Hirudinaktivität in mIU entspricht 1 ATE gleich 33 mIU.

B.4.2 Salben

Für die im Handel befindliche Blutegelsalbe Exhirud^{R} wird der ganze Blutegel verarbeitet. Sie enthält somit den Blutegelrohextrakt mit seinen Inhaltsstoffen, dem Hirudin, den Eglinen und den Bdellinen. Bezogen auf Hirudin sind 100 g Exhirud-Salbe auf 500 ATE standardisiert.

Es kamen folgende Salbenpräparationen zum Einsatz:
- Exhirud^{R}: 500 ATE/100 g Salbengrundlage
- spezielle Anfertigung: 20 000 ATE/40 g entsprechend 50 000 ATE/100 g Salbengrundlage
- Salbengrundlage ohne Inhaltsstoffe

- modifizierte Salbengrundlage ohne Paraffin
- Einzelpräparationen der Bestandteile der Salbengrundlage

Alle Salben wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

B.4.3 Blutegelrohextrakt

Der Rohextrakt wird durch Acetonfällung aus medizinischen Blutegeln gewonnen und auf Antithrombin-Einheiten standardisiert.

Die für die Versuche zur Verfügung gestellte vorgereinigte Präparation war ein Lyophilisat von weißlich-gelber Farbe und mit 36,4 ATE/mg.

Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank.

B.5 Apparaturen

- Photometer
  Für die Enzymmessungen bei 405 nm: Photometer 1 101 von Eppendorf, Hamburg, mit Drucker Typ 024-EA von Kienzle, Villingen.
- Säulenchromatographie
  Die optische Dichte der Säuleneluate wurde bei 256 nm mit dem Durchflußphotometer Uvicord I der Firma LKB (Bromma, Schweden) gemessen. Es wurde automatisch mit dem Gilson Fraktionssammler (Abimed-Gilson, Düsseldorf) fraktioniert. Die Durchflußgeschwindigkeiten der Säulen wurden mit Perpex-Pumpen von LKB mit austauschbaren Getrieben reguliert.
- Elektrophoresen
  Spannungsgerät Power Supply Typ 2 197 von LKB (Bromma, Schweden)

- Zentrifugen
  Tischzentrifugen: Centrifuge 211, Bio Dynamics Inc. (Indianapolis, USA) und Eppendorf Zentrifuge 3 200, Eppendorf (Hamburg)
  Standzentrifugen: Heraeus-Christzentrifuge Typ Mini und Christ-Varifuge S Typ 4 127, beide Heraeus (Osterrode/Harz), sowie Biotronic Model B-20 A Centrifuge, Damon/IEC Division (Needham Heights/Mass., USA)
- Waagen
  Alle von Sartorius (Göttingen): Typ 3 716MP, 2 474, 2 405
- Gerinnungsanalysen
  PTT: Coagulometer nach Schnitger & Gross, Amelung KG (Lemgo-Brake)
  TPZ: Oxford Lancer Coagulyzer Jr., Sherwood Medical Ind. Hammack (Bridgeton, England)
- Gefriertrockner
  Wkf Typ L05-70, Gesellschaft für Elektrophysikalischen Apparatebau (Brandau/Darmstadt)
- Schermaschine
  Aesculap favorita II, Typ GT 104/ GH 204 mit Scherkopf GH 700 1/20 mm, Aesculap (Tuttlingen)

B.6 Andere Materialien

- Dialysierschläuche: Spectrapor-Dialysierschlauch (Art. 94 577), Ausschlußgrenze 3 500 Daltons, Reichelt Chemietechnik (Heidelberg); Visking-Dialysierschlauch (Art. 1 785), Ausschlußgrenze ca. 15 000 Daltons, Roth (Karlsruhe)
- Plastik Plates: Vorbeschichtet (Art. 2 117-406, pkt/50), LKB (s.o.)
- Viscozell: Allzwecktücher (Art. 03 041), Lohmann (Fahr/Rhein)

- Universalindikator pH 0-14, nicht blutend (Art. 9 535), Merck (Darmstadt)
- Plastikküvetten 1 ml, Standardgerinnungsröhrchen aus Plastik
- Insulinspritzen (1 ml/40 IU) Omnifex Plus (mit Sterikan Nadel G26 x 1/2)(Art. 916 131/7), Braun-Melsungen (Melsungen)

C METHODEN

C.0 Immunologische Grundlagen zu den Testsystemen

Als Versuchstiermodelle zum Resorptionsnachweis von Blutegelwirkstoffen dienten die Aktive und Passive Cutane Anaphylaxie in der Haut des Meerschweinchens. Diese immunologischen Methoden gestatten es, kleinste Mengen von reaginen Antikörpern über ablaufende Antigen-Antikörper-Reaktionen nachzuweisen. Grundlage dieses Testverfahrens ist die Induktion der Synthese spezifischer IgE-Antikörper im Meerschweinchenorganismus.

Zum besseren Verständnis des Versuchsaufbaus soll zunächst die cutane anaphylaktische Reaktion definiert, der Ablauf der Reaktion dargelegt und das IgE kurz charakterisiert werden.

In seinen berühmten "Studien über die Überempfindlichkeit" beschreibt PRAUSNITZ und KÜSTNER (1921), wie er die Fischallergie seines Kollegen Küstner auf sich selbst übertragen konnte. Er injizierte sich das Serum Küstners intracutan und löste nach 24 Stunden durch Antigenapplikation an dieselbe Stelle eine positive Hautreaktion aus. Dieses als Prausnitz-Küstner-Reaktion bekannte Phänomen entspricht der Passiven Cutanen Anaphylaxie (PCA).

Das Prinzip der Aktiven Cutanen Anaphylaxie (ACA) ist in Abschnitt C.1.4.1 beschrieben.

Die Immunreaktion (Typ I-Reaktion, Sofortreaktion) der cutanen Anaphylaxie wird nach COOMBS und GELL (1963) charakterisiert als die Reaktion eines Antigens mit Gewebszellen, die durch einen andernorts produzierten Antikörper sensibilisiert sind. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion führt zur Freisetzung von pharmakologisch aktiven Mediatorsubstanzen wie Heparin, Histamin,

Serotonin, 5-Hydroxytryptamin, SRS-A(slow reacting substance of anaphylaxis), ECF-A(eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis), PAF(platelet activating factor), Kallikrein, Bradykinin u.a.m.
Am Ablauf dieser Reaktion ist also nicht die aktiv sensibilisierte, Antikörper produzierende Zelle beteiligt, sondern die passiv sensibilisierte, Antikörper tragende Zelle. Das sind im Blut die basophilen Granulozyten (ISHIZAKA et al. 1970) und im Gewebe die Mastzellen (TOMIOKA und ISHIZAKA 1971).

Die von Paul EHRLICH (1879) entdeckten Mastzellen kommen im ganzen Körper vor, bevorzugt findet man sie aber im Bindegewebe und im Bereich der dermoepidermalen Grenzfläche um kleine Blutgefäße, Nerven und Drüsengänge (HSÜ et al. 1979). Mastzellen und basophile Granulozyten gehören funktionell zum gleichen System. Beide stammen vom Knochenmark ab, vermutlich von ein und derselben Vorläuferzelle (ZUCKER-FRANKLIN 1981). Bei Mensch, Meerschweinchen und Ratte steht einer großen Zahl von Mastzellen eine geringe Menge Basophiler gegenüber (SCHNITZLER 1979). Durch Heparinfreisetzung sollen sie die Bildung von Thrombosen verhindern und über ihr Histamin an der Steuerung der Mikrozirkulation beteiligt sein.

Die an der Immunreaktion der cutanen Anaphylaxie beteiligten Antikörper (hauptsächlich IgE, zum ganz geringen Teil auch IgG) werden wegen ihrer zellhaftenden Eigenschaften auch als zytophil bezeichnet.
Das IgE-Molekül wurde erstmals von ISHIZAKA et al. (1966) identifiziert. Es lagert sich mit seinem Fc-Teil an den spezifischen IgE/Fc-Rezeptor der Mastzell- bzw. Basophilenmembran an (SULLIVAN et al. 1971, KÖNIG 1980). Der Fab-Bereich liegt frei und ist zur Antigenbindung befähigt.
Bei Antigenkontakt (gleichbedeutend mit Allergenkontakt) reagieren je zwei benachbarte Antikörpermoleküle mit einem multivalenten Antigenmolekül unter Änderung ihrer sterischen Konfiguration (bridging). Dieser Vorgang löst einen nicht zellschä-

digenden, energieverbrauchenden und kalziumabhängigen Sekretionsprozeß der basophilen Granula aus, der zur Freisetzung der oben genannten Mediatorsubstanzen führt. Diese Reaktion ist weitgehend unabhängig vom Komplementsystem.

Der Reaktionsmechanismus der PCA ist bis heute noch nicht ganz aufgeklärt (BRANDIS H. 1975). An Stellen der Haut, in die zuvor Antiserum intracutan verabfolgt wurde, läuft nach einer bestimmten Latenzzeit eine AG-AK-Reaktion ab, nachdem das dem Antikörper entsprechende Antigen intravenös injiziert wurde. Als Folge der Mediatorenfreisetzung kommt es lokal zu einer serösen Entzündung mit einem interstitiellen Ödem. Die Gefäßdurchlässigkeit der kleinen Hautgefäße wird erhöht, so daß außer Wasser und Elektrolyten auch Albumine und sogar Gammaglobuline in das Interstitium übertreten können.

Antikörper der IgE-Klasse sind bis heute für folgende Spezies bekannt: Mensch, Affe, Rind, Hund, Maus, Ratte, Kaninchen und Meerschweinchen (STANWORTH 1973, SCHWICK und BRÄUER 1980).

Das menschliche IgE hat ein Molekulargewicht von ca. 200 000 und entspricht in der Struktur prinzipiell dem IgG. Sein Fc-Anteil ist um zwei Teilstücke vergrößert, die der "hinge region" hinzugefügt sind und somit das Molekulargewicht entsprechend erhöhen (HITZIG 1977).
Die Aminosäurensequenz der ε-Kette wurde an Hand eines IgE-Myelomproteins aufgeklärt (BENNICH et al. 1976). Von allen multiplen Myelomen produzieren weniger als 0,01 % monoklonale IgE-Antikörper (GREAVES et al. 1981).

Das IgE ist leicht denaturierbar. 30-minütiges Erhitzen oder Einwirkung von 0,1M 2-Merkaptoäthanol führen im Gegensatz zum IgG zu einer Senkung der Antigenität und heben seine Gewebsbindungsfähigkeit auf (SCHNITZLER 1979). Die Halbwertszeit des IgE beträgt im Serum im Mittel 2-3 Tage, gebunden an Mastzellen oder basophile Granulozyten 9-14 Tage. Ein weiteres Charakteri-

stikum ist sein extrem niedriger Serumspiegel. Er beträgt im Mittel 300 ng/ml. Eine umfassendere Übersicht zu den bis heute bekannten biochemischen und biologischen Daten gibt Tabelle 2.

Die Haupteigenschaft des IgE liegt in seiner längere Zeit anhaltenden, gewebssensibilisierenden Wirkung. Die physiologische Funktion des IgE wird in einer vorzugsweise lokalen Abwehraufgabe im Bereich des Respirations- und Gastrointestinaltraktes gesehen, die mit der des IgA verglichen wurde. Für eine derartige Aufgabe spricht u.a. die höhere IgE-Konzentration in Sekreten verglichen mit Serum (SPIEGELBERG 1974) sowie auch das gehäufte Vorkommen IgE-synthetisierender Plasmazellen in den Schleimhäuten, in lymphatischem Gewebe, das in der Umgebung sekretorischer Drüsen liegt, in Tonsillen und in Bronchial- und Peritoneallymphknoten. In der Milz existieren diese IgE-produzierenden Plasmazellen nur in sehr geringer Zahl und im peripheren Blut und im Knochenmark überhaupt nicht (ISHIZAKA et al. 1973).

Über das IgE des Meerschweinchens liegen nur wenige Daten vor, die in Tabelle 3 zusammengestellt sind (OVARY et al. 1976). Daraus läßt sich jedoch eine große Ähnlichkeit mit dem menschlichen IgE entnehmen. Für eine Sequenzaufklärung stand bis heute zu wenig Material zur Verfügung. Auch trat bisher beim Meerschweinchen kein IgE-produzierendes monoklonales Myelom auf, das zur Materialgewinnung für eine Sequenzanalyse nützlich sein könnte.

Von allen Versuchstieren ist das Meerschweinchen nicht nur das bei Weitem empfindlichste gegenüber cutanen anaphylaktischen Reaktionen, sondern es reagiert auch extrem sensibel auf Immunisierungsversuche. Es genügen mehrmals intraperitoneal injizierte Dosen von 1 µg eines Haptenproteins adsorbiert an Alugel, um deutliche IgE-Antikörpertiter zu erhalten (LEVINE et al. 1971). LEVINE et al. (1971) und OVARY et al. (1976) konnten weiterhin zeigen, daß wiederholt applizierte geringste Antigenmengen, ad-

Tabelle 2 Das menschliche IgE: bekannte Daten und Literaturreferenzen

Molekulargewicht ($x10^3$)	185-200	1, 2
Molekularformel	ϵ_2K_2, $\epsilon_2\lambda_2$	3
Leichte Ketten	2, K+ λ	4
Schwere Ketten	2 ϵ	2, 3
Valenzen für die Antigenbindung	2	2, 3
Sedimentationskonstante	8S	5
Elektrophoretische Mobilität	β1	4
Zahl der 4-Peptideinheiten	1	2, 3
Kohlenhydratanteil	11-12 %	6, 1
% des gesamten Serum-Ig	0,002	2, 3
Untergruppen	keine bekannt	7
Mercaptoäthanolresistenz	negativ	4
Labilität bei 56° C	> 30 min	4, 8
Reaginaktivität	stark positiv	3, 6
Bindung an Hautzellen	Mastzellfixation	6, 1
Komplementfixierung	alternativer Weg	4, 1
Placentapassage	negativ	6, 3
Kolostrumpassage	positiv	7

Konzentration in normalem Erwachsenenserum (2,42 ng = 1I.U.)	300 µg/ml (17-1 000 µg/ml)	7 2, 5
Zur Auslösung der PK-Reaktion erforderliche minimale Antikörpermenge	40-200 pg/ml	1, 7
Halbwertszeit im Plasma	ca. 2 Tage (0,7-4,4 Tage)	3, 4
Halbwertszeit zellgebunden	1-2 Wochen	4, 5
Totales Körper IgE	6,6 µg/kg KG	9
Synthetisierungsrate	2,3 µg/kg/Tag	9
durchschnittliche Menge des zirkulierenden IgE	3,3 µg/kg KG	9
Anteil des intravasculären IgE	51 %	9
davon (intravaskulär) katabolisiert/Tag	71 %	9

[1]GALLY 1973, [2]ROITT 1977, [3]SCHWICK und BRÄUER 1980, [4]SCHNTZLER 1979, [5]SPIEGELBERG 1974, [6]BRANDIS H. 1975, [7]CUNNINGHAM-RUNDLES 1981, [8]RING 1981, [9]ISHIZAKA et al. 1973

Tabelle 3 Das Meerschweinchen IgE: bekannte Daten und Literaturreferenzen

Sedimentationskonstante	8S	1
Molekulargewicht	185 000	1
isoelektrischer Punkt	pH 6,48	1
Hitzelabilität bei 56° C	> 30 min	1, 2
Persistenz in der Haut	45 Tage	3
optimale Sensibilisierungszeit	48 h	3
Serumkonzentration	Spuren	3
	geringer als beim Menschen	4
Bindung an Hautzellen	bis 3 Wochen	1

[1]OVARY et al. 1976, [2]SCHEUBER 1980, [3]MOTA 1981, [4]SPIEGELBERG 1974

sorbiert an Alugel, die IgE-Synthese zu Ungunsten der IgG-Synthese stimulieren. Im Gegensatz dazu produzieren Meerschweinchen bei Gabe desselben Antigens in 100facher Dosierung, inkorporiert an komplettes Freund'sches Adjuvans, zum überwiegendsten Teil Antikörper der IgG-Klasse.

Darüberhinaus reagiert das Meerschweinchen auch gegenüber Substanzen mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht mit der Bildung von Antikörpern. In der Regel sind Substanzen mit einem Molekulargewicht von 5 000 bis 10 000 sehr gering immunogen. SELA (1970) konnte jedoch zeigen, daß verschiedene Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 450 und 1 928 beim Meerschweinchen allesamt eine Antikörperproduktion induzierten.

Diese besonderen Eigenschaften des Meerschweinchens bilden die Grundlage für die vorliegenden Resorptionsversuche. Ziel der Salbeneinreibungen war es, über die intakte Haut eine Induktion der Synthese spezifischer IgE-Antikörper gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B zu erreichen, diese über cutane Antigen-Antikörper-Reaktionen nachzuweisen und somit ein Indiz für die Resorption der Blutegelwirkstoffe zu erbringen.

C.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

C.1.1 Schmierversuche beim Meerschweinchen

Die Durchführung der Versuche erfolgte in vier unterschiedlich langen Schmierperioden mit verschiedenen Gruppen. Innerhalb der Gruppen wurden die Tiere nochmals aufgeteilt. Die Untergliederung kam durch die Anwendung verschiedener Salbenpräparationen zustande.

Die erste Untergruppe wurde nicht geschmiert, die zweite erhielt die Salbengrundlage ohne Wirkstoffe, die dritte die im Handel befindliche Exhirud^{R}-Salbe (standardisiert auf 500 ATE/100 g Salbe) und die vierte eine Spezialanfertigung mit 20 000 ATE/40 g Salbe. Eine detaillierte Aufgliederung gibt Tabelle 4 wieder.

Für diesen Versuchsabschnitt wurden Meerschweinchen der Stämme 2N, 13N und Pirbright White (PW) verwendet, und zwar sowohl weibliche als auch männliche Tiere. Die Dauer der Schmierperioden lag zwischen 2,5 Tagen und 14 Wochen (Tabelle 4). Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 630 g.

Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere jeweils durch Ohrmarken gekennzeichnet und gewogen. Anschließend wurde bei allen der gesamte Rücken bis zum Nacken und Ansatz der Vorder- und Hinterbeine und ebenso der Bauch vorsichtig geschoren und von Haaren gesäubert. Für jede Salbengruppe der einzeln sitzenden Tiere wurde ein eigener Scherkopf verwendet. Mit den Salbeneinreibungen wurde jeweils erst 24 Stunden später begonnen, damit sich eventuell bei der Scherung beigebrachte kleinste Verletzungen schließen konnten. Danach wurden die Meerschweinchen in Untergruppen zu je 2 Tieren aufgeteilt und in die vorgesehenen Käfige gesetzt.

Die Gruppen 0 und A bestanden aus je 8 Tieren, die in je 4 Untergruppen (à 2 Tiere) aufgegliedert waren. Die Meerschweinchen der Gruppe 0 bzw. A wurden jeweils zusammen in einen großen Laufkäfig gesetzt. Die Gruppe D zählte 4 Tiere in 2 Untergruppen, die zusammen in einem großen Makrolonkäfig untergebracht waren. Die Tiere der Gruppe B (8 Meerschweinchen) und E (6 Meerschweinchen) wurden ebenfalls in 4 bzw. 2 Untergruppen aufgeteilt, wobei jedoch jedes Tier in einen eigenen Makrolonkäfig kam. Die Tiere der Gruppen B und E hatten somit keinen Kontakt untereinander. Gruppe H bestand aus zwei Tieren, die zusammen in einem Käfig gehalten wurden.

Tabelle 4 Schmierversuche - Aufgliederung der Meerschweinchen in Gruppen
Experim. Details etc. sind im Text angegeben.

Untergruppen	Gruppe O	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe H	Tiere pro Untergruppe
	← Zahl der Tiere →						
ohne Salbe	2	2	2	-	-	-	6
Salbengrundlage	2	2	2	-	2	-	8
mod. S.gr.	-	-	-	-	4	-	4
500 ATE/100 g	2	2	2	2	-	-	8
20 000 ATE/40 g	2	2	2	2	-	2	10
Tiere/Gruppe	8	8	8	4	6	2	
Dauer der Schmierperiode (Wochen)	14	8	8	8	4	2,5 Tage	
Stamm	2x 2N♂ 6x13N♂	2N♂	3x 2N♂ 5x 2N♀	13N♂	2N♂	PW♂	36 Tiere insgesamt
Schmierperiode	I	II			III	IV	

Die Schmierungen mit den Salben erfolgten mit Einmalhandschuhen in aufsteigender ATE-Konzentration (Tiere der Sammelkäfige) bzw. mit jeweils neuen Handschuhen (Tiere der Einzelkäfige). Diese Vorsichtsmaßnahme sollte verhindern, daß die Meerschweinchen bei der Einreibung mit höheren als den ihnen zugedachten Wirkstoffgehalten in Berührung kamen.

Zu jedem Schmiertermin wurde jedem Tier ein ca. 2,5 cm langer Salbenstrang auf Rücken und Bauch verteilt und möglichst vollständig einmassiert. Makroskopisch durften Salbenreste auf der geschorenen Meerschweinchenhaut nicht mehr erkennbar sein. Während der Dauer der Schmierperioden wurden die Tiere dieser Prozedur jeden Tag 3mal unterzogen, mit regelmäßigen Pausen am Mittwoch,am Samstag und am Sonntag jeder Woche. Mittwochs erfolgte eine Gewichtskontrolle und eine Nachschur.

Die Tiere der Leerwertgruppe (Meerschweinchen ohne Salbenbehandlung) wurden auch geschoren, gewogen, zu jedem Schmiertermin aus dem Käfig genommen und ohne Behandlung wieder zurückgesetzt.

Über die insgesamt während der Versuchsreihe applizierten Wirkstoffmengen pro Gruppe und Tier informiert Tabelle 5. Diese Durchschnittswerte kamen rechnerisch zustande, indem die in den verbrauchten Salbenmengen enthaltenen ATE auf die Anzahl der Meerschweinchen pro Untergruppe umgerechnet wurden.

C.1.2 Fütterungsversuche am Meerschweinchen

Um eine orale Aufnahme und Resorption der Blutegelwirkstoffe aus dem Magen-Darm-Trakt qualitativ hinsichtlich einer Antikörperbildung beurteilen zu können, wurden Fütterungsversuche durchgeführt. Dies geschah in 3 Perioden von einer bis zu 10 Wochen Dauer (Kennzeichnung entsprechend den Perioden der Schmierversu-

Tabelle 5 Übersicht über die applizierte Gesamtwirkstoffmenge in ATE pro Gruppe und Tier bei den geschmierten Meerschweinchen.
Angegeben ist die pro Tier über die Gesamtschmierperiode applizierte ATE-Menge (Mittelwert).

Untergruppen	Gruppe O	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe D	Gruppe E	Gruppe H
ohne Salbe	0	0	0	-	-	-
Salbengrundlage	0	0	0	-	0	-
mod. S.gr.	-	-	-	-	0	-
500 ATE/100 g	850	1 950	2 360	1 950	-	-
20 000 ATE/40 g	120 000	45 830	51 940	45 830	-	9 500
Dauer der Schmierperiode (Wochen)	14	8	8	8	4	2,5 Tage

che). Dabei waren die Tiere ebenfalls in Gruppen und Untergruppen aufgeteilt. Die genaue Aufschlüsselung gibt Tabelle 6 wieder.
Es kamen männliche und weibliche Tiere der Stämme 2N und PW zum Einsatz mit einem Durchschnittsgewicht von 700 g. Bei Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen und mit Ohrmarken versehen, jedoch nicht geschoren. Der Fütterungsplan entsprach zeitlich dem Schmierplan.
Die Tiere der Hauptgruppen lebten jeweils zusammen in einem Käfig. Auch bei der oralen Verabreichung wurden Einmalhandschuhe getragen und zwischen den einzelnen Gruppen gewechselt.

C.1.2.1 Vorversuch

In den Vorversuch kamen die 2 Meerschweinchen der Gruppe "orale Kontrolle". An ihnen sollte überprüft werden, ob und wie ein Fütterungsversuch überstanden wird. Zu diesem Zweck erhielten die beiden Tiere die konzentrierte Salbe (20 000 ATE/40 g) mittels einer Injektionsspritze direkt in das Maul appliziert.
Das eine Meerschweinchen bekam 3mal täglich 0,25 ml Salbe, das andere 3mal 0,5 ml. Nach einer Woche betrug die Gesamtmenge der Salbenaufnahme für das erste Meerschweinchen 3 ml (1 360 ATE), für das zweite 6 ml (2 720 ATE).
Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere durch eine intracardiale Injektion von je 1 ml T61 getötet und obduziert. Von folgenden Organen sind Gewebsproben entnommen und histologisch untersucht worden: Oesophagus, Magen, Jejunum, Ileum, Colon, Leber, Milz und Nieren.

Tabelle 6 Fütterungsversuche - Aufgliederung der Meerschweinchen in Gruppen
Experim. Details etc. sind im Text angegeben.

Untergruppen	orale Kontrolle	Gruppe C	Gruppe F	Gruppe G	Tiere pro Untergruppe
	← Zahl der Tiere →				
500 ATE/100 g	-	2	-	-	2
20 000 ATE/40 g	2	2	3	-	7
ATE-Lösung	-	-	-	3	3
Tiere/Gruppe	2	4	3	3	
Dauer der Fütterungsperiode (Wochen)	1	10	4	4	
Stamm	PW♂	2N♀	PW♀	PW♀	12 Tiere insgesamt
Fütterungsperiode	I	II	III		

C.1.2.2 Verwendete Salben

In der Gruppe C erhielten 2 Tiere 3mal täglich 0,25 ml der Salbe 500 ATE/100 g, die 2 anderen Tiere 3mal täglich 0,25 ml der Salbe 20 000 ATE/40 g in der oben beschriebenen Weise appliziert. Die 3 Meerschweinchen der Gruppe F bekamen jeweils 3mal täglich 25 µl der Salbe 20 000 ATE/40 g (14 ATE/Tag/Tier) verabreicht.

C.1.2.3 Verwendete Lösung

Die 3 Meerschweinchen der Gruppe G erhielten in Form einer Lösung ebenfalls eine Tagesdosis von je 14 ATE/Tag/Tier. Die Aktivität dieser Lösung aus vorgereinigtem Blutegelrohextrakt und Ampuwa^{R} wurde mit dem Fibrinogen-Clotting-Test bestimmt. Bis zur Verwendung blieb diese Flüssigkeit in 0,5 ml-Portionen bei -20°C tiefgefroren.
Die Meerschweinchen erhielten davon 3mal täglich 32 µl (14 ATE) in das Maul (mit einer Eppendorfpipette) verabreicht.
Eine genaue Aufstellung der oral applizierten Gesamt- und Tagesdosen in ATE für alle Gruppen zeigt Tabelle 7. Die Anzahl an ATE wurde gegebenenfalls anhand der Deklaration und des Gewichts der verabreichten Salbe errechnet.

C.1.3 Intraperitoneale Immunisierung von Meerschweinchen

Ziel des Versuches war die Induktion von IgE-Antikörpern gegen die Blutegelrohextraktbestandteile Hirudin, Egline und Bdelline.

Es kamen 12 männliche und weibliche Meerschweinchen des Stammes

Tabelle 7 Übersicht über die oral applizierten Tages- und Gesamtdosen an Blutegelwirkstoffen in ATE

	Tagesdosis (ATE/Tag/Tier)				Gesamtdosis (ATE/Tier)			
Untergruppen	orale Kontrolle	C	F	G	orale Kontrolle	C	F	G
500 ATE/100 g	-	4	-	-	-	300	-	-
20 000 ATE/40 g	136[a]	136	14	-	1 360	12 000	210	-
	272[b]	-	-	-	2 720	-	-	-
Lösung	-	-	-	14	-	-	-	200

[a], 3 x 0,25 ml Salbe; [b], 3 x 0,5 ml Salbe

PW zum Einsatz. Das Durchschnittsgewicht der 9 älteren Tiere (zu Versuchsbeginn ca. 3 Monate) betrug 590 g. 3 Jungtiere kamen am 15. Lebenstag nach der Geburt mit einem Durchschnittsgewicht von 165 g in den Versuch.
Die Meerschweinchen wurden am Versuchsbeginn mit Ohrmarken gekennzeichnet, gewogen, in 3 Gruppen eingeteilt und gruppenweise in verschiedene Käfige gesetzt. Gruppe 1 zählte 8 Tiere (5 ältere und 3 Jungtiere), die Kontroll-Gruppen 2 und 3 je 2 ältere Tiere. Es erfolgte eine wöchentliche Gewichtskontrolle.

Für die Immunisierung wurde vorgereinigter, in Ampuwa^{R} gelöster Blutegelrohextrakt verwendet und dessen Gehalt an ATE mit dem Fibrinogen-Clotting-Test bestimmt. Jeweils 4 ml dieser Lösung wurden im Visking Dialyseschlauch bei 4°C 4 Stunden lang gegen physiologische Kochsalzlösung unter Rühren dialysiert. Um einen eventuellen Wirkstoffverlust bei der Dialyse auszuschließen, ist der Fibrinogen-Clotting-Test danach wiederholt worden.
Die dialysierte Blutegelrohextraktlösung wurde bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt, jeweils bei Bedarf (1mal wöchentlich) bei Zimmertemperatur aufgetaut und daraus wurden nach erneuter Aktivitätsbestimmung jeweils 70 ATE (ca. 88 µl) entnommen.

Pro Tier und Immunisierungsschritt wurden diese Wirkstoffmenge (Gruppe 1) bzw. 200 µl sterile physiologische Kochsalzlösung (Kontroll-Gruppe 2) an je 1 ml steriles Alu Gel S adsorbiert. Die Adsorption erfolgte in einem Plastikreagenzglas bei 4°C unter Rühren während mindestens 1 Stunde, meist jedoch über Nacht (ca. 20 Stunden).

Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) ist nach Herstellervorschrift in sterilem Ampuwa^{R} gelöst und in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht injiziert worden (s. Tabelle 8).
Mit Ausnahme des an Alu Gel S adsorbierten dialysierten Blutegelrohextraktes kamen alle Lösungen steril zur Anwendung.

Tabelle 8 Immunisierungsschema zur Induktion von IgE-Antikörpern beim Meerschweinchen. Angegeben ist die bei der i.p. Injektion verwendete Dosierung pro Tier. Für weitere Details, s. Text.

zeitl. Ablauf	Stimulierung	Gruppe 1	Kontroll-Gruppe 2	Kontroll-Gruppe 3
1. Tag	-	Cy (100 mg/kg KG)	pNaCl (4 ml/kg KG)	Cy (100 mg/kg KG)
3. Tag	1.	dialys. Blutegelroh-extrakt (70 ATE pro 1 ml Alu Gel S)	pNaCl (200 µl pNaCl pro 1 ml Alu Gel S)	pNaCl (1,2 ml)
10. Tag	2.	wie 1. Stimulierung	wie 1. Stimulierung	wie 1. Stimulierung
28. Tag	-	Cy wie oben	pNaCl wie oben	Cy wie oben
30. Tag	5.	wie 1. Stimulierung	wie 1. Stimulierung	wie 1. Stimulierung
usf., s. Text				

Cy, Cyclophosphamid (Endoxan^{R}); pNaCl, physiologische Kochsalzlösung

Das Schema der Immunisierung zeigt Tabelle 8. Sämtliche Lösungen wurden mit einer möglichst dünnen Kanüle (Nr. 17, 18) intraperitoneal injiziert.
Die 9 älteren Meerschweinchen waren 6,5 Monate im Versuch und erhielten in dieser Zeit 6mal Endoxan^{R} appliziert sowie 22 Stimulierungsinjektionen, d.h. insgesamt 1 540 ATE/Tier. Die 3 Jungtiere bekamen während 3 Monaten 3mal Endoxan^{R} verabreicht und 10 Stimulierungsinjektionen, d.h. insgesamt 700 ATE/Tier. Immunisierungsfreie Intervalle von je 1 Woche sind bei den älteren Tieren 5mal und bei den Jungtieren 3mal eingelegt worden.
Antikörpertiterbestimmungen wurden zwischen den einzelnen Boosterungsschritten nicht durchgeführt.

C.1.4 Der Direkte Hauttest (DHT)

C.1.4.1 Prinzip des Tests

Der DHT, der auch als Aktive Cutane Anaphylaxie (ACA) bezeichnet wird, dient zum Nachweis von mastzellgebundenen IgE-Antikörpern in der Haut immunisierter Tiere. Die Art und Weise der Immunisierung spielt dabei keine Rolle.
Voraussetzung für ein positives Ergebnis ist die Bildung eines meßbaren IgE-Antikörpertiters, wobei die IgE-Moleküle zudem an die Mastzellen der Haut gebunden sein müssen.

Zur Auslösung der ACA bzw. um eine eindeutige Aussage zu ermöglichen muß hochgereinigtes Antigen eingesetzt werden. Dies wird dem zuvor immunisierten Tier intracutan verabreicht bei gleichzeitiger intravenöser Injektion eines Farbstoffes (zumeist Evans Blau), der zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion dient. Letztere zeigt sich in einem deutlichen, annähernd runden Farbfleck unterschiedlichen Durchmessers und unterschiedlicher Farbintensität abhängig von der Stärke der Antigen-Antikörper-Reaktion.

Das Antigen wird in einer absteigenden Verdünnungsreihe intracutan appliziert. Über die Zuordnung eines gerade noch positiv definierten Plaquedurchmessers ($\geq$ 5 mm) zur entsprechenden Probenverdünnung kann der Antikörpertiter bestimmt werden.
Zur graduellen Unterscheidung der Intensität der Farbpunkte steht kein objektives Meßverfahren zur Verfügung, sodaß auf die Quantifizierung dieses Parameters verzichtet werden muß.

Die Immunisierung erfolgte bei unseren Versuchen durch intraperitoneale Injektionen, Schmierungen über die intakte Haut, sowie peroral durch Verfütterung der Antigene.

C.1.4.2 Durchführung der Tests

Die 24 Stunden vorher am Rücken und an einem Hinterbein geschorenen, immunisierten Meerschweinchen wurden in Bauchlage mit gestreckten Beinen fixiert. In Lokalanästhesie (Chloräthylspray) wurde die Vena saphena des geschorenen Beines aufgesucht und freipräpariert.
Nach intravenöser Injektion (mit einer Insulinspritze) von 1 ml 1%-iger kristallfreier Evans Blau-Lösung erfolgte die exakt intracutane Applikation des Antigens in einer 5er Verdünnungsreihe (jeweils 100 µl Injektionsvolumen). Dabei wurde für jede Probenverdünnung eine eigene Insulinspritze verwendet. Die Verdünnungsreihe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Der Abstand zwischen den einzelnen Injektionsstellen betrug mindestens 3 cm. Sie wurden zum späteren Wiederauffinden mit einem kräftigen Filzstift punktförmig markiert.
Anschließend wurden die Tiere befreit und 15 Minuten später durch intracardiale Injektion von je 1-2 ml T61 getötet. Nach Abziehen der Rückenhaut erfolgte das Vermessen der Plaques auf der Innen-

seite des Felles gegen eine Kunstlichtquelle. Ein Plaque wurde dann als positive Reaktion gewertet, wenn sein Durchmesser mindestens 5 mm betrug.
Zur Dokumentation wurden die Innenseiten der Felle fotographiert.

C.1.4.3 Bedeutung des Leerwerts (LW)

Als Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines Antigens im DHT gilt die Austestung dieser Substanz an nicht immunisierten Tieren (Leerversuch). Damit soll ausgeschlossen werden, daß das Antigen mit dem Evans Blau direkt, d.h. ohne vorherige Antigen-Antikörper-Reaktion zu einer Plaquebildung führt.
Der Test wurde immer an je 2 Tieren als Doppelversuch ausgeführt. Die Meerschweinchen erhielten 72 Stunden sowie 4 Stunden vor dem DHT das Antigen in unverdünnter Form intracutan gespritzt (100 µl in physiologischer Kochsalzlösung in der im eigentlichen Versuch zur Anwendung kommenden Dosierung).
15 Minuten vor Versuchsende bekamen die Tiere dann wie üblich 1 ml Evans Blau intravenös verabreicht und zusätzlich noch einmal 100 µl des Antigens unverdünnt intracutan injiziert (15 Minuten-Wert). Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben.

Um das Antigen im DHT anwenden zu können, muß der Leerversuch negativ verlaufen, d.h. die Durchmesser der Plaques müssen kleiner als 5 mm sein.

Für folgende Substanzen wurden jeweils im Doppelversuch die Leerwerte für 72 Stunden, 4 Stunden und 15 Minuten ermittelt: vorgereinigter Blutegelrohextrakt, vorgereinigter Blutegelrohextrakt dialysiert (Visking Dialyseschlauch, bei 4°C gegen aqua dest. über 48 Stunden, mehrmaliger Wechsel des aqua dest., Rühren), reines Hirudin (Charge 1 und 2), reines Eglin b und Bdellin B. Alle übrigen Substanzen wurden im Doppelversuch nur

für den 15 Minuten-Wert getestet (genaue Aufstellung: siehe Tabelle 9).

Die Leerwerttestung erfolgte an männlichen und weiblichen Meerschweinchen der Stämme 2N und PW mit einem Durchschnittsgewicht von 750 g.

C.1.4.4 Im DHT getestete Substanzen und Meerschweinchengruppen

Tabelle 9 gibt eine Zusammenstellung der im Leerwertversuch bzw. DHT getesteten Substanzen, z.T. mit Angabe der intracutan injizierten Mengen sowie gegebenenfalls der Probenverdünnung. Letztere wurden alle mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Die Seren der Gruppe H (2,5 Tage geschmierte Meerschweinchen, Herstellung der Seren s. C.3.1.1) sowie das Kontrollserum eines unbehandelten Meerschweinchens wurden einem intraperitoneal, mit dialysiertem, vorgereinigtem Blutegelrohextrakt immunisierten Meerschweinchen der Gruppe 1 intracutan gespritzt. Damit sollten über den DHT freie, im Serum der geschmierten Tiere befindliche Blutegelwirkstoffe nachgewiesen werden.

Tabelle 10 faßt die im DHT überprüften Meerschweinchengruppen zusammen: Es sind jeweils die intracutan applizierten Antigene angegeben, sowie die Austestung im Konzentrat und/oder in der Probenverdünnung. Dazu ist anzumerken, daß im DHT an einem Tier gleichzeitig mehrere Substanzen in genügendem Abstand gespritzt und ausgetestet werden können.

Sojabohnentrypsininhibitor (SBTI, Molekulargewichtsgröße ca. 22 000) und physiologische NaCl wurden dabei als Kontrollsubstanzen verwendet, um sicher zu stellen, daß die getesteten

Tabelle 9 Im Leerwertversuch (LW) bzw. DHT getestete Substanzen

Substanz	eingesetzte Menge	Probenverdünnung	LW/DHT
Hirudin, Charge 1-4	100 µg/100 µl	1:5	LW;DHT
Eglin b	80 µg/100 µl	1:5	LW;DHT
Bdellin B	200 µg/100 µl	1:5	LW;DHT
SBTI	100 µg/100 µl	-	LW;DHT
BBI	100 µg/100 µl	-	LW
Blutegelrohextrakt^{v}	19 mg/100 µl	1:5	LW
Blutegelrohextrakt^{vd}	4,8 mg/100 µl	-	LW
Meerschweinchenurine (verschieden aufbereitet, s.C.4)	je 100 µl	-	LW
Alu Gel S	100 µl	-	LW
Endoxan	100 µl	-	LW
NaCl-Lösung, 0,9 %	100 µl	-	LW;DHT
NaCl-Lösung, 5 %	100 µl	-	LW
NaCl-Lösung, 10 %	100 µl	-	LW
NaCl-Lösung, 20 %	100 µl	-	LW
Ampuwa	100 µl	-	LW
Harnstoff, 6 mM	100 µl	-	LW
HAc, 0,1 M	100 µl	-	LW
8 Einzelsubstanzen der S.gr.	je 100 µl^{a}	-	LW;DHT
S.gr. (3 Chargen)	100 µl	-	LW
Meerschweinchenserum (Kontrolle)	100 µl	-	LW;DHT
Seren Gruppe H	100 µl	-	DHT

^{a}, gemäß der prozentualen Zusammensetzung der Salbengrundlage, gelöst in pNaCl (steril);
^{v}, vorgereinigt; ^{vd}, vorgereinigt und dialysiert

Tabelle 10 Im DHT getestete Meerschweinchengruppen

V, in Verdünnungsreihe getestet, maximal bis Verdünnung $1:5^{12}$
K, unverdünnt (im Konzentrat) getestet
-, Substanz nicht getestet

Gruppe	Immunisierung	intracutan getestete Antigene					
		Hirudin	Eglin b	Bdellin B	SBTI	pNaCl	6 Einzelsubstanz. der S.gr.
O	I.Schmierung	V	-	-	-	-	-
A	II.Schmierung	V	-	-	-	-	-
B	II.Schmierung	V	K	K	-	-	-
D	II.Schmierung	V	K	K	K	K	K
E	III.Schmierung	V	K	K	K	K	-
C	gefüttert	V	K	K	K	K	K
F	gefüttert	V	K	K	K	K	-
G	gefüttert	V	K	K	K	K	-
1	i.p.	V od. K	V od. K	V od. K	K	K	-

Meerschweinchen nur mit den zuvor zugeführten Antigenen eine cutane Anaphylaxiereaktion zeigten und diese nicht auch durch unspezifische Fremdeinflüsse ausgelöst wurde.

Bei den geschmierten bzw. oral sensibilisierten Meerschweinchengruppen betrug die Latenzzeit zwischen letzter Schmierung und Durchführung des DHT mindestens 24 Stunden.
Bei den Meerschweinchen der Gruppe 1 (intraperitoneal immunisiert) lagen mindestens 10 Tage zwischen der letzten Boosterung und der Durchführung des DHT.

C.1.5 Nachweis von Meerschweinchen-IgE-Antikörpern durch Passive Cutane Anaphylaxie (PCA)

C.1.5.1 Prinzip des Tests

Die von OVARY (1964) eingeführte Methode der PCA dient zum Nachweis von IgE-Antikörpern, z.T. auch von IgG-Antikörpern der Subklasse IgG1 (GALLY 1973) in der Haut neutraler, d.h. nicht immunisierter Tiere. Wie bekannt, können reagine Meerschweinchenantikörper der IgE- und IgG-Klasse in der Haut anderer Meerschweinchen dargestellt werden (ISHIZAKA K. 1973).

Es wird dazu das Serum immunisierter Tiere in einer Verdünnungsreihe in die Haut nicht immunisierter Meerschweinchen gespritzt. Nach einer Sensibilisierungszeit von 72 Stunden, die für die Bindung der IgE-Antikörper an die Mastzellen der Haut nötig ist, erfolgt die Auslösung der Antigen-Antikörperreaktion durch intravenöse Verabreichung des Antigens zusammen mit Evans Blau als Farbindikator. Nach Vermessen der Plaques wird diejenige reziproke Serumverdünnung als PCA-Titer definiert, die noch in der Lage ist, die Bildung eines Farbhofes von mindestens 5 mm Durchmesser auszulösen.

C.1.5.2 Durchführung des Tests

Für die PCA-Reaktion kamen männliche und weibliche, nicht immunisierte Meerschweinchen der Stämme 2N und PW mit einem Durchschnittsgewicht von 640 g zur Verwendung.
Vor Durchführung des Tests wurden die Tiere am Rücken und einem Hinterbein geschoren. Nach 24 Stunden wurden dann je 100 µl des auszutestenden Antikörperserums und teilweise dieses in Verdünnungsreihen (2er Schritt, hergestellt mit steriler pNaCl) im Abstand von 3 cm in die Rückenhaut intracutan appliziert. Die Injektionsstelle wurde mit einem Filzstift markiert.

Zusätzlich wurde z.T. ein Kontrollversuch mit 100 µl des für 30 Minuten auf 56°C erhitzten Antikörperserums (ebenfalls intracutan injiziert) durchgeführt. Nach einer Sensibilisierungszeit von 68 Stunden wurden zum Nachweis bzw. Ausschluß reaginer Antikörper der IgG-Klasse (SCHEUBER und BECK 1980) z.T. noch einmal 100 µl des nicht erhitzten Antikörperserums intracutan gespritzt.

72 Stunden nach Testbeginn erfolgte die Auslösung der PCA-Reaktion durch intravenöse Gabe (in die V. saphena des Hinterbeins) von 1 ml 1%igem Evans Blau, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung, zusammen mit mindestens 500 µg des Antigens. 30 Minuten später wurde das Meerschweinchen durch intracardiale Injektion von 1-2 ml T61 getötet, die Rückenhaut wurde dann abgezogen und die Plaques wurden nach der oben beschriebenen Weise vermessen (siehe C.1.4.2).

C.1.5.3 Mit Hilfe der PCA getestete Seren

Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die mittels der PCA auf Antikörper der IgE-Klasse getesteten Meerschweinchenseren. Die maximal gespritzte Serumverdünnung betrug 1:1024.

Tabelle 11 Anzahl der mittels der PCA auf IgE-Antikörper getesteten Meerschweinchenseren
+, getestet; -, nicht getestet
( ), Zahl der pro Inhibitor getesteten Seren

Gruppe	Zahl getesteter Seren	Immunisierung	Verwendetes Antigen Hirudin	Eglin b	Bdellin B
O	6	I. Schmierung	+ (6)	-	-
A	8	II. Schmierung	+ (8)	+ (3)	+ (3)
B	4	II. Schmierung	+ (4)	+ (2)	+ (1)
1	7	intraperitoneal	+ (7)	+ (7)	+ (7)

C.2 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Pathologisch-anatomische Untersuchungen wurden stichprobenmäßig durchgeführt.

C.2.1 Obduktion

Bei der Obduktion der Meerschweinchen erfolgte eine Entnahme aller thorakalen sowie abdominalen Organe. Sie wurden makroskopisch beurteilt und gezielt biopsiert. Eine Übersicht der ausgeführten Obduktionen findet sich in Tabelle 12.

Tabelle 12 Obduzierte Meerschweinchen

[a] orale Kontrolle

Gruppe	Behandelt mit Salbe [ATE/40 g]	Stamm	Tier Nr.	Gewebsproben für Histologie
o.K.[a]	20 000	PW♂	270	Magen, Duodenum
o.K.[a]	20 000	PW♂	271	Oesophagus, Magen, Jejunum, Ileum, Leber, Milz, Niere
A	20 000	2N♂	282	---

C.2.2 Histologie

Nach 48stündiger Fixierung in 5%igem Formalin und anschliessender Einbettung in Paraffin wurden mit einem Mikrotom ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und routinemäßig mit Hämalaun-Eosin und nach van Gieson gefärbt. Die Hautpräparate wurden zusätzlich nach Giemsa, mit PAS sowie Toluidin Blau gefärbt. (Nähere Angaben zur mikroskopischen Technik, s. ROMEIS 1968).
Eine Aufstellung der histologisch untersuchten Gewebeproben findet sich in Tabelle 13.

C.3 Hämatologische Untersuchungen

C.3.1 Gewinnung, Aufbereitung und Aufbewahrung des Blutes

Tabelle 13 Aufstellung der histologisch untersuchten Gewebsproben

Gruppe	Behandelt mit Salbe bzw.	Stamm	Tier Nr.	histologisch untersuchte Gewebsproben
0	500 ATE/100 g	13N♂	000	Rückenhaut (vor DHT)
	500 ATE/100 g	13N♂	205	Bauchhaut (nach DHT)
	500 ATE/100 g	13N♂	205	Rückenhaut-Plaques (nach DHT)
B	o.S.	2N♀	269	Bauchhaut (vor DHT)
	20 000 ATE/40 g	2N♀	288	Bauchhaut (vor DHT)
Kontrollen (LW)	Blutegelrohextrakt^{v}	PW♀	2	Rückenhaut-Plaques (nach DHT)
	Blutegelrohextrakt^{vd}	PW♂	1	Rückenhaut-Plaques (nach DHT)
"orale Kontrolle"	20 000 ATE/40 g	PW♂	270	Magen, Duodenum
	20 000 ATE/40 g	PW♂	271	Oesophagus, Magen, Jejunum, Ileum, Leber, Milz, Niere

^{v} vorgereinigt; ^{vd} vorgereinigt und dialysiert

C.3.1.1 Meerschweinchen

Die Blutentnahme beim Meerschweinchen (2-3 ml) erfolgte am fixierten Tier durch Kardialpunktion. Bei den geschmierten Meerschweinchengruppen O, A und B betrug die Latenzzeit zwischen letzter Schmierung und Blutabnahme mindestens 24 Stunden. Bei den Tieren der Gruppe 1 (intraperitoneal immunisiert) lagen 10 Tage zwischen der letzten Stimulierung und der Blutabnahme. Bei den beiden Meerschweinchen der Gruppe H erfolgten insgesamt 6 Blutentnahmen (an 2 verschiedenen Tagen), und zwar 35, 45, 50, 55, 80 und 90 Minuten nach der letzten Schmierung. Die Tiere wurden bei der letzten Abnahme entblutet.

Das Blut wurde in Plastik-Reagenzröhrchen gefüllt, eine Stunde bei 37°C in den Brutschrank gestellt und anschließend 24 Stunden in den Kühlschrank bei 4°C. Daraufhin wurde der Blutkuchen abgestochen und das Serum durch Zentrifugation folgendermaßen gewonnen:

- Blut der Gruppen O, A, B und 1: 20 Minuten bei 4°C und 2 800 U/min (Biotronic Centrifuge), danach Abkippen des Überstandes und nochmaliges Zentrifugieren desselben unter denselben Bedingungen.
- Blut der Gruppe H: 2mal 20 Minuten bei 2 200 U/min und bei Zimmertemperatur (Christ-Varifuge S).

Bis zur Verwendung wurden die abpipettierten Seren der Gruppen A und B bei -80°C, die der Gruppen O, H und 1 bei -30°C aufbewahrt. Zur Austestung der Seren auf Blutegelwirkstoffe bzw. Antikörper gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B siehe Tabelle 10 und 11.

C.3.1.2 Kaninchen

Für die Gerinnungsuntersuchungen wurden 7 nicht vorbehandelte männliche und weibliche Kaninchen des Stammes Deutscher Riese mit einem Durchschnittsgewicht von 4,5 kg verwendet. Die Blutabnahme erfolgte jeweils an der lateralen Ohrvene. Für die Bestimmung des Quickwertes und der partiellen Thromboplastinzeit wurden in einer Einmalspritze 0,4 ml 3,8%iges Natriumcitrat vorgelegt und mit Blut auf 4 ml ergänzt. Die Gewinnung der Plasmen erfolgte durch Zentrifugation: 10 Minuten bei 2 200 U/min (Christ-Varifuge S) und Zimmertemperatur. Die Bestimmung der Gerinnungsparameter TPZ und PTT wurde sofort daran anschließend durchgeführt.

C.3.2 Gerinnungsuntersuchungen an Kaninchenplasmen

Mit dieser Versuchsreihe sollte festgestellt werden, welchen Einfluß vorgereinigte Blutegelrohextraktlösungen (in pNaCl) auf die Parameter TPZ und PTT von Kaninchenplasmen haben.

C.3.2.1 Quick-Wert (Thromboplastinzeit = TPZ)

C.3.2.1.1 Prinzip des Tests

Der Quick-Wert dient der Überprüfung des Extrinsic-Systems der Gerinnung (QUICK 1935) und erfaßt in erster Linie die Aktivität von drei der vier Faktoren des Prothrombinkomplexes, nämlich Faktor II (Prothrombin), Faktor VII und Faktor X. In zweiter Linie, d.h. mit geringerer Empfindlichkeit, mißt der Test auch

Faktor V und Faktor I (Fibrinogen) (BARTHELS und POLIWODA 1980).

Im Quick-Test wird die Zeit vom Augenblick der Zugabe von Gewebsthromboplastin und Kalzium zum Citratplasma bis zur faßbaren Fibrinentwicklung in Sekunden gemessen und an Hand von Normbezugskurven in Prozent "Gerinnungsaktivität" angegeben.
Werte von 100 % bis 70 % liegen im Bereich der Norm.

C.3.2.1.2 Durchführung des Tests

Thromborel^{R} (Calciumhaltiges Human-Thromboplastin) nach Packungsvorschrift lösen und 15 Minuten bei 37°C vortemperieren. 100 µl Kaninchencitratplasma im Coagulyzer eine Minute bei 37°C inkubieren. 200 µl Thromborel^{R} (37°C) zupipettieren. Gerinnungseintritt abwarten, Zeit in Sekunden notieren und an Hand der Bezugskurve den Quick-Wert ermitteln.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und deren Mittelwert errechnet. Als Kontrolle liefen vor jeder Testreihe in Doppelbestimmungen mit: Kontroll-Plasma N (human), Ci-trol-1 und Ci-trol-2.
Die Thromboplastinzeit wurde vor und nach Zugabe von Blutegelrohextraktlösung definierter Aktivität (2 ATE bzw. 2,5 ATE/100 µl Kaninchencitratplasma, bei den Kontrollen identische Volumina physiologischer Kochsalzlösung) ermittelt.

C.3.2.2 Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

C.3.2.2.1 Prinzip des Tests

Die Partielle Thromboplastinzeit (PROCTOR und RAPAPORT 1961)

dient der Überprüfung des Intrinsic-Systems der Gerinnung und ist in erster Linie abhängig von den Vorphasenfaktoren VIII, IX, XI und XII sowie den Faktoren des Kallikrein-Kinin-Systems. In zweiter Linie erfaßt die PTT auch die Faktoren II, V, X und das Fibrinogen.

Gegenüber der früher gebräuchlichen Recalcifizierungszeit bietet die PTT den Vorteil der geringeren Schwankungsbreite, der Unabhängigkeit von der Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktion sowie der rascheren Durchführbarkeit (BARTHELS und POLIWODA 1980).
Durch Zugabe eines standardisierten Phospholipids sowie von oberflächenaktiven Substanzen (Kaolin, Celit) und Calcium zum Citratplasma kommt es nur in Anwesenheit der Vorphasenfaktoren zur Gerinnung, deren Eintritt in Sekunden gemessen wird. Der Normalbereich der PTT liegt zwischen 35 und 50 Sekunden.

C.3.2.2.2 Durchführung des Tests

Coagulometer mindestens eine halbe Stunde, Calciumchlorid-Lösung (0,025 mol/l) 10 Minuten bei 37°C vorwärmen. Pathromtin^{R} nach Packungsvorschrift lösen. In ein Gerinnungsröhrchen 100 µl Kaninchencitratplasma und 100 µl Pathromtin^{R} pipettieren und zwei Minuten bei 37°C inkubieren. Die Reaktion wird mit 100 µl Calciumchlorid-Lösung gestartet und die Zeit bis zur erfolgten Gerinnung in Sekunden ausgedrückt.

Es wurden Doppelbestimmungen, auch mit Kontrollplasmen (Kontrollplasma N, Ci-trol-1, Ci-trol-2), durchgeführt. Zur Ermittlung der Hemmaktivität des Blutegelrohextraktes wurden zu jeweils 100 µl Kaninchencitratplasma 1,6; 2; 2,5 und 68 ATE oder entsprechende Volumina an physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt.

C.3.3 Herstellung der Ig-Rohfraktion

Die Blutabnahme bei 5 Meerschweinchen der Gruppe O erfolgte im Verlauf der Austestung im DHT und zwar nach Evans Blau-Gabe und unmittelbar vor Tötung der Tiere. Das hatte zur Folge, daß das Blut und auch das Serum intensiv blau gefärbt waren. Um diese Blaufärbung für den PCA-Test wieder zu eliminieren, wurden die Immunglobuline ausgefällt und danach mehrfach gewaschen.

C.3.3.1 Herstellung der Ammoniumsulfatlösung

4M Ammoniumsulfatlösung wird mit halbkonzentriertem Ammoniak auf pH 7,0 eingestellt, filtriert und bei 37°C aufbewahrt.

C.3.3.2 Fällung

Äquivalenten Mengen einer Mischung aus Vollserum und pNaCl-Lösung wurden langsam im Eisbad aliquote Volumina der 4M Ammoniumsulfatlösung unter ständigem Rühren (Eisbad, 4°C) zugesetzt, 20 Stunden nachgerührt und anschließend bei 5 000 U/min und 4°C 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit PBS-Puffer II versetzt bis eine klare Lösung resultierte. Anschließend erfolgte unter Eiskühlung eine erneute Fällung mit Ammoniumsulfatlösung im Volumenverhältnis 1:1, Rühren der Suspension für 1 Stunde und erneutes Zentrifugieren (Bedingungen s.o.). Das Sediment wurde wiederum gelöst und die Präzipitation wurde nochmals durchgeführt. Das danach erhaltene Sediment wurde in möglichst wenig PBS-Puffer II gelöst und gegen ein 10- bis 20-faches Vo-

lumen von PBS-Puffer II dialysiert, bis das Außendialysat SO_4^{--} frei war.
Nun erfolgte eine Umdialyse gegen TRIS-Glycin-Puffer (pH 7,6) während zwei Tagen bei zweimaligem Pufferwechsel pro Tag. Das nach Abschluß der Dialyse erhaltene Retentat wurde durch Ultrafiltration konzentriert (SCHEUBER 1977) und die so gewonnenen Ig-Rohfraktionen bei -30°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

C.4 Urinuntersuchungen

Ziel dieser Versuche war der Nachweis der Ausscheidung von Hirudin im Urin des Meerschweinchens nach Salbenschmierung der Haut sowie intraperitonealer Injektion des vorgereinigten Blutegelrohextraktes.Zu diesem Zweck wurden folgende Tests herangezogen: Fibrinogen-Clotting-Test, Chromozym TH-Test, Rocket-Immunelektrophorese, Radiale Immundiffusion nach Mancini sowie der DHT (s.a. C.1.4.4).

C.4.1 Gewinnung, Aufbereitung und Aufbewahrung des Urins

Für einige Voruntersuchungen kam zusätzlich der Urin von nicht vorbehandelten Kaninchen, von Ratten und Menschen zur Anwendung. Zur Uringewinnung saßen die Meerschweinchen (Stämme 2N, 13N und PW), Kaninchen (Stamm Deutscher Riese) und Ratten (Stamm Wistar, weiblich) jeweils für 24 Stunden in Einzelstoffwechselkäfigen. Die Tiere erhielten während dieser Zeit ihr gewohntes Futter und Wasser. Diejenigen Meerschweinchen, die sich im Schmierversuch befanden, wurden weiterhin 3mal täglich geschmiert.
Vom Menschen verwendeten wir Mittelstrahlurin.
Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 2°C und 3 300 U/min

(Christ-Zentrifuge Typ Mini) wurde der Überstand abpipettiert, das Urinvolumen bestimmt sowie bei den Meerschweinchen- und Kaninchenurinen das pH gemessen.
Die angegebenen Tests wurden entweder unmittelbar danach ausgeführt oder die Urine wurden bis zur Verwendung bei -30°C tiefgefroren. Nach dem Auftauen erfolgte nochmaliges Zentrifugieren (gleiche Bedingungen wie oben).

C.4.2 Dialyse

Zur Austestung der Urine von 4 unbehandelten Meerschweinchen im DHT (Leerwert) mußten diese weitestgehend entsalzt sein. Dazu wurden jeweils 3 ml des zentrifugierten Urins 16 Stunden bei 4°C unter Rühren gegen 600 ml aqua dest. dialysiert (Dialyseschlauch der Fa. Roth) und anschließend bei -30°C tiefgefroren.

C.4.3 Gelchromatographie

C.4.3.1 Sephadex G-10

Als weiteres Verfahren zur Entsalzung der Urine der 4 nicht vorbehandelten Meerschweinchen diente die Gelchromatographie an Sephadex G-10.
Chromatographiebedingungen: Plastik-Säule von 0,9 x 12 cm gefüllt mit Sephadex G-10, Elutionspuffer: 0,1M HAc, pH 2-3, Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/h, Fraktionsvolumen: 0,75 ml, eingesetzte Probe je Lauf: 1 ml zentrifugierter Meerschweinchenurin (unvorbehandelt).

Nach Austestung der eluierten Fraktionen auf Chloridionen mit Silbernitratlösung/Salpetersäure wurden die chlorid-freien Fraktionen gepoolt, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Chloridionen-haltige Fraktionen wurden verworfen.

C.4.3.2 Sephadex G-25 fine

Die Urine von 4 Meerschweinchen der Gruppe O (Schmierperiode I, je ein Tier pro Untergruppe) entsalzte ich an Sephadex G-25 fine.
Chromatographiebedingungen:
Plastik-Säule von 2,2 x 32 cm gefüllt mit Sephadex G-25 fine, Elutionspuffer: 0,1M HAc, pH 2-3, Durchflußgeschwindigkeit: 6 ml/h, Fraktionsvolumen: 3 ml, eingesetzte Probe je Lauf: 5 ml zentrifugierter Meerschweinchenurin der Gruppe O.
Nach Austestung der eluierten Fraktionen auf Chloridionen mit Silbernitratlösung/Salpetersäure wurden die chlorid-freien Fraktionen gepoolt, lyophilisiert und bis zur Austestung mit der Mancini-Methode im Kühlschrank aufbewahrt. Chloridionen-haltige Fraktionen wurden verworfen.

C.4.4 Enzymhemmtests

Hier sollte untersucht werden, ob mit Hilfe spezifischer Enzymhemmtests die Ausscheidung von resorbiertem Hirudin im Urin nachweisbar ist.

C.4.4.1 Fibrinogen-Clotting-Test

C.4.4.1.1 Prinzip des Tests

Grundlage des Tests ist die Umwandlung einer definierten Menge Fibrinogens zu Fibrin innerhalb einer vorgegebenen Zeit durch Zugabe von Thrombin. Die Entstehung des Gerinnsels (Clot) ist abhängig von der Menge des zugesetzten Thrombins. Bei Anwesenheit eines spezifischen Thrombininhibitors (z.B. Hirudin) im Testsystem benötigt man nun für die Bildung des Clots ein Mehrfaches an Thrombin, da das durch den Inhibitor gebundene Enzym für die Umwandlung des Fibrinogens nicht mehr zur Verfügung steht. Über diesen zusätzlichen Thrombinbedarf kann die Anwesenheit von hemmaktivem Hirudin erfaßt sowie dessen Menge (ausgedrückt in ATE/ml) berechnet werden.

C.4.4.1.2 Durchführung des Tests

Der Inhalt eines Fläschchens Behring Test-Thrombin (30 IU) wird unmittelbar vor Testbeginn in 1 ml 0,85%iger NaCl-Lösung gelöst. Diese Lösung ist bei Zimmertemperatur ca. 4-6 Stunden verwendbar.
Der Inhalt eines Fläschchens Behring Test-Fibrinogen (60 mg) löst sich in 6 ml 0,85%iger NaCl-Lösung während 2-3 Stunden langem Rühren bei Zimmertemperatur. Die Lösung kann bei Aufbewahrung während der testfreien Zeiten im Kühlschrank bis zu 2 Tagen verwendet werden.
In jedes Gerinnungsröhrchen pipettiert man hintereinander (20°C):

100 µl der Fibrinogenlösung
100 µl des Veronalpuffers
100 µl 0,85% NaCl-Lösung → Leerwertbestimmung o d e r
100 µl Urin → Aktivitätsbestimmung

Damit beträgt das Endvolumen pro Teströhrchen 300 µl.
Die Bestimmungen erfolgten im Wasserbad bei 37°C, ansonsten nach den Angaben von MARKWARDT (1956, Hirudin-Titration) und PLANTORGAN (1980).
Die Formel für die Berechnung der Hemmaktivität lautet:

(µl Thrombinlösung in der Probe - µl Thrombinlösung im Leerwert) x 60 x 10 x Verdünnungsfaktor = ATE/ml der Probe bzw. des Urins.

Die Nachweisgrenze des Testsystems für Hirudin liegt bei ca. 3-6 ATE/ml.

C.4.4.1.3 Mit dem Fibrinogen-Clotting-Test untersuchte Urine

Nachstehende 24 Stunden-Urine nicht vorbehandelter Individuen kamen in den Versuch (sog. Leerurine):

13 Meerschweinchen: männl. und weibl. Tiere, alle 3 Stämme;
5 Kaninchen: männl. und weibl. Tiere, Deutscher Riese;
5 Ratten: weibliche Tiere, Wistar;
menschlicher Urin.

Die Leerurine wurden z.T. nach 8-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank bei -4°C nochmals getestet.
Die Hemmaktivität von Urinen der intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen der Gruppe 1 (s. C.1.3) ist mehrfach bestimmt worden, und zwar bei nicht behandelten Tieren sowie in verschiedenen zeitlichen Abständen nach intraperitonealer Injektion des vorgereinigten, an Alu Gel S adsorbierten Blutegelrohextraktes (nach 6,5, 24 und 28 Stunden).

C.4.4.2 Chromozym TH-Test I

Chromozym TH eignet sich als chromogenes Substrat für die kinetische Aktivitätsbestimmung von Thrombin. Es kann in allen Systemen eingesetzt werden, in denen
- Thrombin vorliegt (direkte Messung der Thrombinaktivität)
- Thrombin entsteht (z.B. Prothrombinbestimmung)
- Thrombin inaktiviert wird (z.B. durch Hemmung mittels Hirudin).

Thrombin spaltet aus dem farblosen Substrat Chromozym TH p-Nitroanilin ab, das bei 405 nm photometrisch gemessen wird. Das pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitroanilin ist proportional der Thrombinaktivität im Bestimmungsansatz. Die Hydrolyse von 1 µmol Substrat pro Minute bei 25°C entspricht dabei 1 Enzymeinheit (U), die Hemmung einer Enzymeinheit entspricht 1 Inhibitoreinheit (IU). Die Hemmaktivitätsmessung erfolgt nach Inkubation des Enzyms mit dem Inhibitor für 5 Minuten im entsprechenden Puffer vor Zugabe der Substratlösung (DUCKERT 1976).

C.4.4.2.1 Durchführung des Tests

Der Inhalt eines in 1 ml aqua bidest. unmittelbar vor Testbeginn gelösten Fläschchens Behring Test-Thrombin (30 IU) wurde mit aqua bidest. im Verhältnis 1:20 verdünnt (Aufbewahrung während der Versuche entweder im Eisbad bei 4°C oder im Kühlschrank, Verwendung innerhalb von 4 Stunden).
Der Inhalt eines Fläschchens Chromozym TH, in 5 ml aqua bidest. gelöst und mit aqua bidest. im Verhältnis 1:1 verdünnt, wurde während des Tests bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Verwendbarkeit liegt bei ca. 2 Monaten.

Testansatz pro 1 ml-Plastikküvette (25°C):

(0,95-x) ml TRA-Puffer I
0,05 ml Behring Test-Thrombin, Verdünnung 1:20
x ml Testurin, zentrifugiert

mit Plastikspatel mischen, 5 Minuten inkubieren
Start mit 0,15 ml Chromozym TH Verdünnung 1:1

Wellenlänge: 405 nm. Messung der Extinktion über 6 Minuten. Die Nachweisgrenze des Chromozym TH-Tests für Hirudin liegt bei 0,8 ATE/ml.
Bei allen Chromozym TH-Testreihen lief jeweils mindestens ein Leerwert ohne Urin mit. Die Urine wurden während der Versuche bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

C.4.4.2.2 Stabilität des Thrombins

Zur Bestimmung der Stabilität des Thrombins während der Testung nach dem obigen Schema erfolgten Messungen über 2 - 3 Stunden in 20 minütigem Abstand (Leerwertbestimmung ohne Urinzugabe).

C.4.4.2.3 Stabilität des Hirudins im Urin

Um die Stabilität des Hirudins im Urin über mindestens 24 Stunden zu verfolgen, fügten wir verschiedenen Urinproben von Kaninchen und Ratten vorgereinigten Blutegelrohextrakt hinzu. Die Konzentration in den Proben betrug jeweils 1,1 ATE/ml Urin. Wir testeten jeweils gleiche Mengen Leerurin gegen "Hirudin-Urin" sofort nach dem Ansetzen der Proben sowie nach 1,5, 20 und 80 Stunden.

Um die Hitzebeständigkeit des Hirudins zu überprüfen, wurden die oben genannten "Hirudin-Urin"-Proben geteilt und jeweils eine Hälfte 10 Minuten auf 80°C erhitzt (MARKWARDT 1963). Die mit Leitungswasser wieder gekühlten und zentrifugierten Proben (Tischzentrifuge: 5 Minuten, 3 500 U/min) wurden in den Chromozym TH-Test I eingesetzt, zum Vergleich auch äquivalente Mengen nicht erhitzter "Hirudin-Urin"-Proben.

C.4.4.2.4 Mit dem Chromozym TH-Test I untersuchte Urine

Folgende 24-Stunden Urine nicht vorbehandelter Individuen kamen in den Versuch (Leerurine):

11 Meerschweinchen: männl. und weibl. Tiere, 3 Stämme,
7 Kaninchen: männl. und weibl. Tiere, Deutscher Riese,
2 Ratten: weibliche Tiere, Wistar.

Alle Leerurine der oben genannten Tiere testeten wir gegen ihre Urinproben mit künstlich zugesetztem Blutegelrohextrakt ("Hirudin-Urine", s.o.). Die Überprüfung der Hitzebeständigkeit des Hirudins erfolgte in Kaninchen- und Rattenurinen (siehe C.4.4.2.3).

C.5 Aktivitätsbestimmung von Hirudinlösungen

Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die mit dem jeweiligen Test untersuchten Proben.

C.5.1 Fibrinogen-Clotting-Test

Er wurde für folgende Bestimmungen eingesetzt:

- Aktivitätsmessung der vorgereinigten Blutegelrohextraktlösung für die orale Verfütterung an Meerschweinchen (Gruppe G): Einstellung auf 14 ATE/Tier/Tag, einmalige Aktivitätsbestimmung.
- Aktivitätsmessung der vorgereinigten sowie dialysierten Blutegelrohextraktlösungen für die intraperitoneale Immunisierung von Meerschweinchen: Einstellung auf 70 ATE/Tier/Tag/Immunisierungsschritt, der Aktivitätsverlauf der Proben wurde über mehrere Wochen verfolgt.
- Aktivitätsmessung der vorgereinigten Blutegelrohextraktlösung für die Zugabe zu Kaninchenplasmen: Überprüfung der Beeinflussung von Quick und PTT, einmalige Bestimmung.
- Aktivitätsbestimmung von aus Blutegelrohextrakt isoliertem, hochgereinigtem Hirudin: verwendet zum Einsatz in DHT und PCA, Mehrfachbestimmungen.
- Oben beschriebene Urinuntersuchungen (s. C.4.4.1.3).

C.5.2 Chromozym TH-Test I

Folgende Bestimmungen wurden durchgeführt:

- Aktivitätsmessungen von vorgereinigten Blutegelrohextraktlösungen.
- Oben beschriebene Urinuntersuchungen (s. C.4.4.2.4).

C.5.3 Chromozym TH-Test II

Dieser Test stellt eine Modifikation des Chromozym TH-Test I dar. Er eignet sich besonders für Messungen mit hochgereinig-

tem Hirudin.

Den Inhalt eines Fläschchens Behring Test-Thrombin (30 IU) löst man unmittelbar vor Testbeginn in 6 ml Phosphatpuffer (Na_3PO_4) pH 6,5. Die Lösung teilt man in ca. 200 µl-Portionen (Eppendorfgefäße) auf und friert die nicht benötigten Proben bis zur Verwendung bei -30°C ein. Die zum Einsatz kommende Lösung wird im Eisbad bei 4°C oder im Kühlschrank aufbewahrt.

Den Inhalt eines Fläschchens Chromozym TH löst man in 10 ml aqua bidest. TRA-Puffer II = TRA-Puffer I + 0,05 % Triton X-100. Alle Hirudinlösungen sowie deren Verdünnungen werden mit 0,05 % (g/V) Triton X-100 versetzt.

Testansatz pro 1 ml-Plastikküvette (25°C):

(0,98-x) ml TRA-Puffer II
0,02 ml Behring Test-Thrombin (s.o.)
x ml Probelösung

mischen, 5 Minuten inkubieren
Start mit 0,125 ml Chromozym TH (s.o.)

Übrige Meßbedingungen wie Chromozym TH-Test I.

C.6 Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II

Es sollte auch mit einer vom biologischen Testmodell unabhängigen Methode, dem Chromozym TH-Test II, versucht werden, gegen Hirudin gerichtete Antikörper vom Meerschweinchen nachzuweisen.

Das Prinzip des Tests besteht in der Inkubation ("Vorinkubation") einer die spezifischen Antikörper enthaltenden Serumverdünnungsreihe mit jeweils einer gleichbleibend definierten

Menge an Hirudin und der anschließenden Bestimmung der Hemmaktivität dieser Lösungen im Chromozym TH-Test II mittels jeweils derselben im Testansatz vorgelegten Thrombinmenge.
Im Serum enthaltene, gegen Hirudin gerichtete Antikörper reagieren bei der Vorinkubation mit dem zugegebenen Hirudin (zum Antigen-Antikörper-Komplex), sodaß dieses nicht mehr für die Thrombinhemmung im Chromozym TH-Test II zur Verfügung steht.

Dazu wurden die Seren der intraperitoneal mit dem an Alu Gel S adsorbierten, vorgereinigten Blutegelrohextrakt immunisierten Meerschweinchen (Gruppe 1) verwendet.
Es kamen ein Pool, bestehend aus 7 Einzelseren, sowie die Einzelseren von 5 dieser Meerschweinchen zur Austestung. Als Kontrollen dienten ein normales Serum sowie ein hitzeinaktiviertes (30 Minuten bei 56°C) Serum von nicht immunisierten Meerschweinchen.

Verdünnungsreihen in 2er Schritten (mit pNaCl) bis maximal 1:4 096 vom Serumpool und den Einzelseren untersuchten wir in zwei Testreihen mit Inkubationszeiten von 5 Minuten mit hochgereinigtem Hirudin inkubiert, alle 5 Einzelseren zusätzlich jeweils 1 Stunde.
Vom Hirudin wurden pro Küvette und Serumverdünnung 100 µl einer definierten Lösung mit einer Gesamtaktivität von 0,6 ATE (0,1 µg) eingesetzt.

Als Kontrollen dienten folgende Tests:

- Titration einer definierten Menge an Thrombin mit steigenden Volumina einer definierten Hirudinlösung (hochgereinigt). Dazu wird jeweils die verbleibende Thrombinaktivität nach Vorinkubation mit dem Hirudin gemessen.
- Titration des Thrombins mit steigenden Mengen an Kontrollserum (hitzeinaktiviert, unverdünnt)
- Titration des Thrombins mit steigenden Mengen an Kontrollserum (unverdünnt)
- Titration des Thrombins mit Kontrollserum in einer 2er-Schrittreihe (bis 1:512) ohne Hirudinzusatz

- Titration des Thrombins mit einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe (bis 1:8) des Kontrollserums (hitzeinaktiviert) bei jeweils konstantem Hirudinzusatz.
- Titration des Thrombins mit einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe (bis 1:8) des Kontrollserums bei jeweils konstantem Hirudinzusatz.

C.6.1 Inkubation von 5 Minuten

Testansatz pro 1 ml-Plastikküvette (25°C):

(0,98-x) ml TRA-Puffer II
0,02 ml Behring Test-Thrombin
0,05 ml Serum in steigender Verdünnung (2er Schritt)
0,1 ml Hirudinlösung (mit 0,05 % Triton X-100)

mit Plastikspatel mischen, 5 Minuten inkubieren
Start mit 0,125 ml Chromozym TH-Lösung

Zusätzlich wurde jedes Serum unverdünnt und ohne Hirudinzugabe getestet.

C.6.2 Inkubation von 1 Stunde

Vom unverdünnten Serum und seinen 2er-Schritt-Verdünnungen inkubierten wir jeweils 0,05 ml mit 0,1 ml Hirudinlösung in einem Eppendorfgefäß für 1 Stunde bei Zimmertemperatur. Anschließend Zugabe von jeweils 0,83 ml TRA-Puffer II, Mischen der Probe, 2minütiges Zentrifugieren bei 3 200 U/min (Tischzentrifuge) und Pipettieren in eine 1 ml-Plastikküvette. Nach Zugabe von jeweils 0,02 ml Thrombin Mischen der Probe (Plastikspatel), 5 Minuten Inkubieren bei 25°C und Starten mit 0,125 ml Chromozym TH.

Auch bei dieser Meßreihe wurde jedes Serum unverdünnt und ohne Hirudinzugabe getestet.

C.7 Immundiffusionstechniken

Mit diesen Techniken werden Antigene und Antigenbruchstücke, die noch antigene Determinanten besitzen, in Körperflüssigkeiten (z.B. Serum, Harn) und sonstigen Lösungen nachgewiesen.

Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Rocket-Immunelektrophorese und radialen Immundiffusion nach Mancini sind dabei:

- Es müssen monospezifische Antikörper (Antiseren) für das Antigen bzw. letzteres in reiner Form vorhanden sein.
- Die Antigenkonzentration in der Körperflüssigkeit muß im Nachweisbereich der Methode liegen.
  (Rocket: 10^{-6} g/ml, Mancini: 10^{-5} g/ml)
- Der Antigen-Antikörper-Komplex muß schwer löslich und präzipitierende Antikörper gut anfärbbar sein (SAWATZKI 1981).

Die hier durchgeführten Tests können lediglich als Pilotstudien angesehen werden, da sie nur für Einzelurine und nicht routinemäßig angewandt wurden.

C.7.1 Rocket-Immunelektrophorese

Die Rocket-Immunelektrophorese nach LAURELL (1972), auch zweidimensionale Immunelektrophorese genannt, stellt eine einfache und reproduzierbare Methode zur quantitativen Bestimmung eines einzelnen Proteins in einer Proteinmischung dar.

Das Prinzip besteht darin, daß die Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt wird, welches den monospezifischen Antikörper enthält. Die Antigenprobe wird in kleine, gleich große Stanzlöcher aufgetragen. Unter dem Einfluß eines elektrischen Potentialunterschiedes wandert das Antigen in das Antiserumhaltige Gel und kann anhand des entstehenden raketenförmigen Präzipitats(= Rocket) quantifiziert werden. Die Rocket-Höhe ist der Menge des Antigens in etwa proportional.

C.7.1.1 Durchführung

Herstellung des 1 %igen Agarosegels: Lösung von 1 g Agarose und 3 g PEG (Polyäthylenglykoll) in 100 ml Quiep-Puffer, pH 8,6 im Wasserbad bei 96°C in 20 min. Jeweils 12,5 ml des Gels werden in einem Reagenzglas auf 56°C abgekühlt, mit 250 µl Antiserum (2 %ige Lösung) versetzt und auf eine bereits vorbeschichtete Plastikplatte (Plastic Plate, LKB) verteilt. Nach Auskühlen des Gels (feuchte Kammer, 10 Minuten) Ausstanzen der 4 mm großen Löcher.
In der Elektrophoresekammer (bis zu 3 Platten, Puffertröge gefüllt mit 1 l Quiep-Puffer, 10°C, Pufferbrücken: je 4 Lagen Viscozell/Plattenseite) Auftragen der Proben sowie der internen Standard- und Kontrollösungen (je 20 µl) und Anschließen der Pole (Spannung 40 V/4 cm, Laufzeit 4 Stunden).
Anschließend werden die Folien mit aqua dest. gespült, 15 Minuten gepreßt, 2mal 30 Minuten in 0,15M NaCl-Lösung und 1mal 30 Minuten in aqua dest. gewaschen, 15 Minuten gepreßt, 5 Minuten getrocknet (Föhn), in Färbelösung 30 Minuten gefärbt, 3mal 10 Minuten in Entfärberlösung entfärbt und zuletzt nochmals getrocknet.
Nun können die Rockets vermessen werden.

Entfärbelösung: 1 l Methanol, 1 l aqua dest. 220 ml Eisessig.
Färbelösung: 1 g Coomassie Brillant Blue R-250, 200 ml Entfärbelösung.

C.7.1.2 Eingesetzte Antikörperseren und Urine

Antikörpergele (jeweils IgG-Antikörper von Kaninchen) mit:

- Hirudin-Antikörpern
- Eglin-Antikörpern
- Blutegelrohextrakt-Antikörpern

Folgende 24 Stunden-Meerschweinchenurine wurden jeweils zentrifugiert (5 Minuten, Tischzentrifuge) und unverdünnt (20 µl) eingesetzt:

- 4 Leerurine unbehandelter Meerschweinchen (Kontrollurine)
- 2 Urine geschmierter (20 000 ATE/40 g) Meerschweinchen
- 1 Urin Salben (20 000 ATE/40 g) gefüttertes Meerschweinchen
- 2 Urine, gewonnen durch Blasenpunktion nach PCA-Tests und bekannter, mittels des Fibrinogen-Clotting-Tests bestimmter Aktivität in ATE/ml.

C.7.2 Radiale Immundiffusion nach Mancini

Die Mancini-Technik, auch einfache radiale Immundiffusion genannt (MANCINI et al. 1965), beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die Rocket-Immunelektrophorese.
Aus dem den monospezifischen Antikörper enthaltenden Agarosegel werden kleine, gleich große Löcher ausgestanzt, in die das betreffende Standardantigen in einer Verdünnungsreihe sowie die zu untersuchenden Proben aufgetragen werden. Das Antigen diffundiert radial und es entstehen Präzipitationsringe, deren Fläche der Konzentration des Antigens weitgehend proportional ist. Man kann auf diese Weise unter standardisierten Bedingungen quantitative Bestimmungen vornehmen.

C.7.2.1 Durchführung

Herstellung des 1 %igen Agarosegels: 1 g Agarose und 3 g PEG in 100 ml PBS-Puffer I (pH 7,2) nach der in C.7.1.1 beschriebenen Vorschrift lösen. Antiserumzugabe pro 12,5 ml Gel: 250 µl (2 %ige Lösung). Beschichtung der Plastic Plates (LKB), Auskühlung und Stanzung siehe C.7.1.1 Stanzendurchmesser: 2,5 mm.

Die Probenvolumina (je Loch 5 µl) wurden unmittelbar nach Stanzung aufgetragen. Die Diffusion erfolgte in einer feuchten Kammer über 48 Stunden, das anschließende Färben und Entfärben nach den in C.7.1.1 beschriebenen Methoden.
Vermessen der Präzipitationsdurchmesser in mm.

C.7.2.2 Eingesetzte Antikörperseren und Urine

Antikörpergele (jeweils IgG-Antikörper von Kaninchen) mit:

Hirudin-Antikörpern
Blutegelrohextrakt-Antikörpern

In einer ersten Testreihe wurden zentrifugierte (5 Minuten, Tischzentrifuge) 24 h-Urine von Meerschweinchen unverdünnt auf Hirudin-Antikörpergele aufgetragen:

4 Leerurine unbehandelter Meerschweinchen (Kontrollurine)
2 Urine geschmierter (20 000 ATE/40 g) Meerschweinchen
1 Urin Salben (20 000 ATE/40 g) gefüttertes Meerschweinchen
2 Urine, gewonnen durch Blasenpunktion nach PCA-Tests und bekannter, mittels des Fibrinogen-Clotting-Tests bestimmter Aktivität in ATE/ml.

Für eine zweite Testreihe wurden 4 Urine der Schmiergruppe O (pro Untergruppe der 24 Stunden-Urin eines Meerschweinchens)

säulenchromatographisch auf einer Sephadex G-25 fine Säule entsalzt und in einer 10er-Schritt-Verdünnungsreihe (bis 1:1 000, hergestellt mit pNaCl) auf das Hirudin-Antikörpergel und das Blutegelrohextrakt-Antikörpergel aufgetragen.

D ERGEBNISSE

D.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

D.1.1 Reaktion der Meerschweinchen auf die Schmierungen

Die Meerschweinchen gewöhnten sich rasch, d.h. innerhalb weniger Tage an die Schmierprozedur.

D.1.1.1 Hautreaktionen

Frühestens 4 Tage nach der ersten Schmierung traten bei fast allen Tieren in unterschiedlichen Abstufungen Hautrötungen auf, die sich bei erneuter Schmierung verstärkten und während den Tagen der Salbenpause wieder abschwächten.
Die Rötungen erschienen zunächst am Bauch und an den Flanken, später auch am Rücken. Die mit der stärksten Wirkstoffkonzentration (20 000 ATE/40 g) geschmierten Tiere zeigten auch die ausgeprägtesten Hautreaktionen. Diese Meerschweinchen - insbesondere des Stammes 13N - reagierten z.T. zusätzlich mit der Ausbildung eines stecknadelkopfgroßen papulösen Exanthems von roter Farbe, das sich vor allem an Bauch und Rücken ausbreitete.

Eine genaue Aufstellung über das erstmalige Auftreten der Hautrötung nach Schmierung findet sich in Tabelle 14.
Bei der Gruppe O (Schmierperiode I: alle Untergruppen in einem Käfig untergebracht) fällt auf, daß auch die Tiere ohne Salbeneinreibung ab dem 15. Tag seitlich an den Flanken eine Hautrötung zeigten.

Tabelle 14 Erstmaliges Auftreten der Hautrötung nach Schmierung
Angabe in Tagen.

Untergruppen	Gr. 0	Gr. A	Gr. B	Gr. D	Gr. E	Gr. H
o.S.	15.	-	-			
S.gr.	12.	20.	5.		4.	
mod. S.gr.					4.	
500 ATE/100 g	12.	20.	20.	5.		
20 000 ATE/40 g	9.	12.	6.	5.		-
Stamm	2N♂ 13N♂	2N♂	2N♀,♂	13N♂	2N♂	PW♂
Tiere/Gruppe	8	8	8	4	6	2

-, keine Hautrötung aufgetreten

Das Ausmaß der Hautrötungen zwang einige Male zum Aussetzen der Schmierungen für einige Tage bis maximal eine Woche. Die Hauterscheinungen klangen dann jeweils rasch ab. Dies dauerte bei den Tieren mit der höchstkonzentrierten Wirkstoffsalbe am längsten.

Beim erneuten Schmieren traten die Hauterscheinungen nach immer längeren Zeitabständen und in immer schwächerer Ausprägung auf, bis sie sich gar nicht mehr nachweisen ließen. Bei den Meerschweinchen mit der starken Wirkstoffsalbe hielt sich das Exanthem am längsten.

Bei den Tieren der geschmierten Untergruppen fiel weiterhin auf, daß der Haarwuchs an der Bauchseite mit zunehmender Schmierdauer immer spärlicher wurde. Am stärksten ausgeprägt war diese Erscheinung wiederum bei den mit der starken Wirkstoffsalbe behandelten Meerschweinchen.

D.1.1.2 Gewichtsentwicklung

Tabelle 15 gibt eine Übersicht über die Gewichtsentwicklung der geschmierten Meerschweinchen mit zunehmender Schmierdauer. Für jede Hauptgruppe (O, A, B, D, E, H) wurde für die angegebenen Zeitabschnitte (2,4,8,14 Wochen) aus den Gewichten der Tiere aller Untergruppen jeweils der Mittelwert in Gramm errechnet.

Die letzte Spalte gibt für die oben angegebenen Zeitintervalle den errechneten Mittelwert der Gewichtsabnahmen der Tiere aller Gruppen wieder (s.a. Tabelle 18 und Abbildung 5).
Praktisch alle Tiere aller Schmiergruppen haben mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich und z.T. erheblich an Gewicht verloren. Das Ausgangsgewicht vor Schmierbeginn betrug im Mittel 630 g. Das heißt, daß die Meerschweinchen bei nicht limitiertem Futter innerhalb 2 Wochen ca. 9 %, innerhalb 8 Wochen ca. 12 %

Tabelle 15 Gewichtsentwicklung der geschmierten Meerschweinchen (MW[a] g/Tier) über einen Zeitraum von 2,5 Tagen bis 14 Wochen

+, Zunahme in g; -, Abnahme in g

Versuchsdauer (Wochen)	Gr. 0	Gr. A	Gr. B	Gr. D	Gr. E	Gr. H	MW[b]
2,5 Tage						-18	
2	-137	-28	-67	-56	- 9		-58
4	-132	-28	-68	-84	+29		-57
8	-126	-54	-68	-68			-79
14	-123						-123
Tiere/Gruppe	8	8	8	4	6	2	34
Stamm	2N♂ 13N♂	2N♂	2N♀,♂	13N♂	2N♂	PW♂	

[a] Mittelwert aus der jeweiligen Anzahl der Tiere pro Gruppe

[b] Mittelwert aus der Gewichtsentwicklung aller Gruppen für die entsprechende Versuchsdauer

und innerhalb 14 Wochen rund 20 % ihres Körpergewichts verloren. Dabei fällt auf, daß die Tiere in der Zeit von der 2. bis zur 4. Woche kaum an Gewicht verloren haben.
Die stärkste Gewichtsabnahme erfolgte bei den Meerschweinchen der Gruppe O, die sich hauptsächlich aus Tieren des Stammes 13N zusammensetzte.
Kein Tier verstarb während der 4 Schmierperioden.

D.1.2 Reaktion der Meerschweinchen auf die Fütterung

Die Meerschweinchen ließen sich ohne Widerstand mit den Salbenpräparationen füttern. Die orale Gabe der Blutegelextraktlösung war am einfachsten, da die Wirkdosis in einem kleinen Tropfen gegeben werden konnte.
Während der Fütterungsperiode waren die Tiere in ihrem Verhalten unauffällig, keines der Meerschweinchen verstarb.
Die Gewichtsentwicklung der gefütterten Meerschweinchen während der Dauer der Fütterungsperioden zeigt Tabelle 16. Die Zahlenwerte wurden wie in Abschnitt D.1.1.2 ausgeführt berechnet.
Der 10-Wochen-Wert für die letzte Spalte (für alle Gruppen errechneter Mittelwert) wurde nicht angegeben, da die Zahl von 4 Meerschweinchen nicht repräsentativ ist gegenüber 10 - 12 Tieren bei den anderen Gruppen.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die gefütterten Meerschweinchen während der gesamten Versuchsdauer kontinuierlich an Gewicht zunahmen. Das mittlere Ausgangsgewicht von 700 g stieg innerhalb von 4 Wochen durchschnittlich um 10 %.

Tabelle 16 Gewichtsentwicklung der gefütterten Meerschweinchen (MW[a] g/Tier) über einen Zeitraum von 1 bis 10 Wochen

+, Zunahme in g

Versuchsdauer (Wochen)	orale Kontrolle	Gr. C	Gr. F	Gr. G	MW[b]
1	+ 78	+ 9	+ 37	+ 43	+ 42
2		+ 24	+ 62	+ 62	+ 49
4		+ 25	+ 98	+101	+ 75
10		+ 42			
Tiere/Gruppe	2	4	3	3	12
Stamm	PW♂	2N♀	PW♀	PW♀	

[a] Mittelwert aus der jeweiligen Anzahl der Tiere pro Gruppe

[b] Mittelwert aus der Gewichtsentwicklung aller Gruppen für die entsprechende Versuchsdauer

D.1.3 Reaktion der Meerschweinchen auf die intraperitoneale Immunisierung

Die wöchentlichen Injektionen zeigten bei den Tieren keine Nebenwirkungen. Ein einmalig bei einem Meerschweinchen aufgetretener Spritzenabszeß heilte nach Inzision spontan ab.
Während der Versuchsdauer verstarb keines der Tiere.
Den Gewichtsverlauf während der gesamten Versuchsperiode veranschaulicht Tabelle 17. Die Zahlenwerte wurden wie in Abschnitt D.1.1.2 ausgeführt berechnet. Die ausgewachsenen Tiere und Jungtiere wurden in 2 Gruppen aufgeteilt, da junge Meerschweinchen in der ersten Wachstumsphase überproportional an Gewicht zunehmen und dadurch mit älteren, ausgewachsenen Tieren nicht vergleichbar sind.

Tabelle 17 Gewichtsentwicklung der intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen (MW[a] g/Tier) über einen Zeitraum von 1 bis 26 Wochen

+, Zunahme in g

Versuchsdauer (Wochen)	ältere Tiere (3 Monate)	Jungtiere (15 Tage)
1	+ 32	+ 52
2	+ 48	+ 104
4	+ 74	+ 210
8	+ 171	+ 367
12	+ 216	+ 487
26	+ 253	
Tiere/Gruppe	9	3
Stamm	PW♀,♂	PW♀,♂

[a] Mittelwert aus der jeweiligen Anzahl der Tiere pro Gruppe

Das Ausgangsgewicht der älteren Tiere (3 Monate) betrug im Mittel 590 g, das der Jungtiere (15 Tage bei Versuchsbeginn) 165 g. Alle Meerschweinchen nahmen während der Versuchsdauer kontinuierlich an Gewicht zu. Das heißt, daß die älteren Meerschweinchen innerhalb von 2 Wochen 8 %, von 4 Wochen 13 %, von 8 Wochen 29 % und innerhalb von 14 Wochen auf 37 % ihres Ausgangsgewichts zugenommen haben.

D.1.4 Vergleich der Gewichtsentwicklung bei geschmierten, gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen

Tabelle 18 gibt eine vergleichende Übersicht der Gewichtsent-

Tabelle 18 Gewichtsentwicklung (MW[a] g/Tier): Vergleich der geschmierten, oral gefütterten und i.p. immunisierten Meerschweinchen über einen Zeitraum von 1 bis 26 Wochen

+, Zunahme in g, -, Abnahme in g

Versuchsdauer (Wochen)	geschmiert	oral	i.p.[b]
1	n.d.	+42	+ 32
2	- 58	+49	+ 48
4	- 57	+75	+ 74
8	- 79		+171
12	n.d.		+216
14	-123		n.d.
26			+253
Gesamtzahl der Tiere	34	12	9
Stamm	13N♂ 2N♀,♂	PW♀,♂ 2N♀	PW♀,♂

[a] Mittelwert aus der Gewichtsentwicklung aller Gruppen für die entsprechende Versuchsdauer

[b] nur ausgewachsene Tiere; n.d., nicht durchgeführt

wicklung der geschmierten, gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen. Die Zahlen sind Mittelwerte aus allen Hauptgruppen, ausgedrückt in Gramm/Tier (s. auch D.1.1.2).
Abbildung 5 stellt diesen Gewichtsverlauf graphisch dar. Daraus geht eindeutig hervor, daß die gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen praktisch gleichlaufend kontinuierlich an Gewicht zunahmen, während die geschmierten Meerschweinchen eine diametral entgegengesetzte Reaktion, eine stetige Gewichtsabnahme zeigten. Diese war während der ersten zwei Versuchswochen besonders ausgeprägt.
Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man vom durchschnittlichen Ausgangsgewicht (der geschmierten, gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen) vor Versuchsbeginn den Mittelwert der Gewichtsänderung in Prozent vom Ausgangsgewicht angibt. Diese Zahlen sind Tabelle 19 zu entnehmen.

D.1.5 Der Direkte Hauttest

D.1.5.1 Leerwerte

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Leerwerttestungen ist in Tabelle 20 wiedergegeben (s. auch Tabelle 9: Im Leerwertversuch (LW) bzw. DHT getestete Substanzen). N e g a t i v bedeutet, daß die betreffende Substanz zusammen mit Evans Blau allein keine Plaquebildung bewirkte, also im DHT einsetzbar war. Ein p o s i t i v e s Ergebnis (blaue Plaquebildung) identifizierte die Substanz als nicht verwendbar im DHT.
Die Angaben gelten, falls nicht ausdrücklich anders vermerkt, für den 72- und 4-Stunden- sowie den 15-Minuten-Wert.

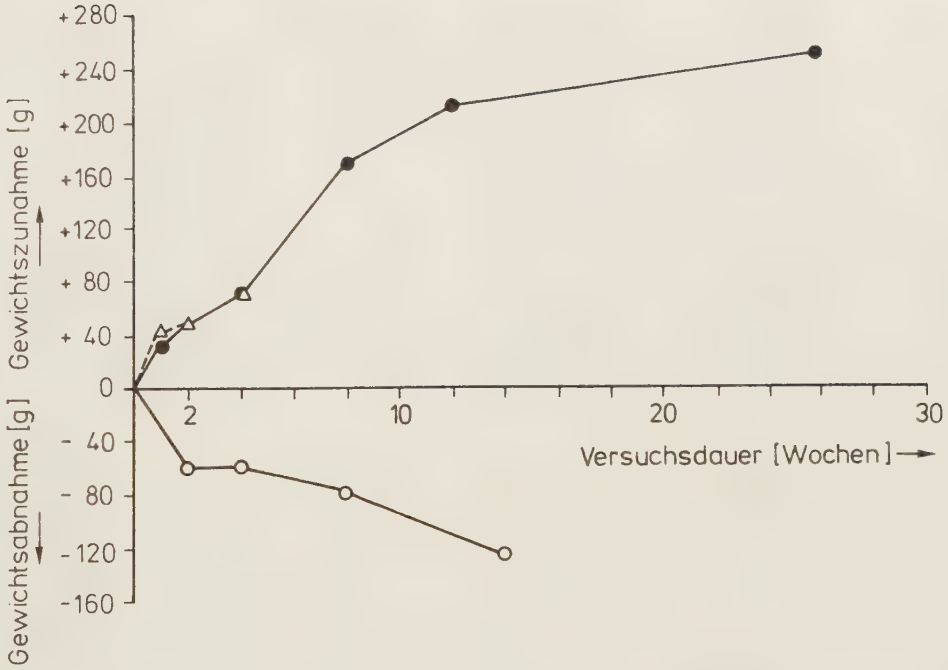


Abb. 5 Gewichtsentwicklung der verschieden behandelten Meerschweinchengruppen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer
●, intraperitoneal immunisiert; ▲, oral gefüttert; o, geschmiert

Tabelle 19 Vergleichende Abweichung vom Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn (MW[a]%/Tier) der geschmierten, oral gefütterten und i.p. immunisierten Meerschweinchen über einen Zeitraum von 1 bis 26 Wochen

+, Zunahme in %; -, Abnahme in %

Versuchsdauer (Wochen)	geschmiert	oral	i.p.[b]
1	n.d.	+ 6	+ 5
2	- 9	+ 7	+ 8
4	- 9	+10	+13
8	-12		+29
12	n.d.		+37
14	-20		n.d.
26			+42
Gesamtzahl der Tiere	34	12	9
Stamm	13N♂ 2N♀,♂	PW♀,♂ 2N♀	PW♀,♂

[a] Mittelwert aus der Gewichtsentwicklung aller Gruppen für die entsprechende Versuchsdauer

[b] nur ausgewachsene Tiere; n.d., nicht durchgeführt

Tabelle 20 Zusammenstellung der Ergebnisse der Leerwerttestungen im DHT

+, positiv -, negativ

Substanz	Ergebnis des Leerwerttests (blaue Plaques)	braun-rote Plaques (≧ 5 mm Durchmesser)
Hirudin, Charge 1-4	-	-
Eglin b	-	-
Bdellin B	-	-
SBTI	-	-
BBI	+	-
Blutegelrohextrakt^{v}	-(72h); +(4h,15')	-(15'); +(72h,4h)
Blutegelrohextrakt^{vd}	-(72h,4h); +(15')	-(72h,15'); +(4h)
Meerschweinchenurine (verschieden aufbereitet, s.C.4)	+ (alle)	+ (alle)
Alu Gel S	+	+
Endoxan	+	-
NaCl-Lösung, 0,9 %	-	-
NaCl-Lösung, 5 %	+	+
NaCl-Lösung, 10 %	+	+
NaCl-Lösung, 20 %	+	+
Ampuwa	-	+
Harnstoff, 6 mM	-	+
HAc, 0,1 M	+	+
8 Einzelsubstanzen der S.gr., in pNaCl	+ (2 davon) - (6 davon)	- (alle)
S.gr. (3Chargen)	+ (alle)	- (alle)
Meerschweinchenserum (Kontrolle)	-	-

^{v} vorgereinigt; ^{vd} vorgereinigt und dialysiert

Bei den mit positiv angegebenen Substanzen traten z.T. zusätzlich zu den blauen Plaques braun-rote Farbflecke auf (s. Spalte braun-rote Plaques). An diesen Stellen wurden Hautbiopsien entnommen und histologisch untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Abschnitt D.2.2.

Die Leerwerttestung des vorgereinigten Blutegelrohextraktes ergab bei der unverdünnten Lösung (19 mg/100 µl) für den 4-Stunden- und 15-Minuten-Wert sowie in der Verdünnung 1:5 (3,8 mg/100 µl) für den 15-Minuten-Wert positive blaue Farbplaques. Braun-rote Plaques zeigten sich bei der unverdünnten Lösung für den 72- und 4-Stunden-Wert sowie in der Verdünnung 1:5 für den 4-Stunden-Wert.
Entsprechend den oben genannten Ergebnissen konnten nachstehend aufgeführte Substanzen im DHT an immunisierten Meerschweinchen eingesetzt werden:
Hirudin (Charge 1-4), Eglin b, Bdellin B, SBTI, pNaCl, 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage sowie Meerschweinchenseren.

D.1.5.2 Geschmierte Meerschweinchen

Eine Übersicht der Ergebnisse aller an geschmierten Meerschweinchen ausgeführten DHTs geben die Tabellen 21a und 21b.

Hirudin wurde in einer 5er-Schritt-Verdünnungsreihe ausgehend von 100 µg bis maximal 2 pg (Verdünnung $1:5^{11}$), von den übrigen Substanzen jeweils die unverdünnte Ausgangslösung getestet. Die angegebenen Zahlenwerte verstehen sich als gemessene mm Plaquedurchmesser.
Die letzte Zahl einer Hirudin-Verdünnungsreihe gibt den noch als positiv zu wertenden Plaquedurchmesser ($\geq$ 5 mm) an.
Das Zeichen Ø bedeutet, daß die betreffende Substanz getestet

Tabelle 21a Geschmierte Meerschweinchen der Gruppen O und A: Ergebnisse des DHT, ausgedrückt in mm Plaquedurchmesser, ausgelöst durch Hirudin (intracutan injiziert)

				Hirudin											
				[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 ml											
Gruppe	Salbe	Stamm[a]	Tier Nr.	[1:5^0 100µg	1:5^1 20µg	1:5^2 4µg	1:5^3 800ng	1:5^4 160ng	1:5^5 32ng	1:5^6 6,4ng	1:5^7 1,3ng	1:5^8 256pg	1:5^9 51pg	1:5^{10} 10pg	1:5^{11}] 2pg
O (Z)	o.S.	2N	202	16	13	10									
	o.S.	2N	246	14	12										
	S.gr.	13N	22	16	13	7	5								
	S.gr.	13N	227	16	13	9	8	7	6	5					
	500 ATE[b]	13N	000	✠											
	500 ATE[b]	13N	205	12	8	5									
	20 000 ATE[c]	13N	99	19	17	15	12	10	8	6	5				
	20 000 ATE[c]	13N	100	20	19	18	15	11	9	6					
A (Z)	o.S.	2N	250	10	9	8	7	7	7	7	6	6	6	5	
	o.S.	2N	251	9	5										
	S.gr.	2N	326	10	8	8	7	7	7	7	6	6	5		
	S.gr.	2N	349	20	15	13	12	10	10	9	9	8	8	7	-
	500 ATE[b]	2N	254	8											
	500 ATE[b]	2N	303	9	8	6	6	5	5						
	20 000 ATE[c]	2N	255	21	18	15	12	12	12	11	8	8	7	7	-
	20 000 ATE[c]	2N	282	Ø											

[a] alle Tiere männlich; [b]/100 g; [c]/40 g; (Z), Tiere zusammen gelebt; Ø, keine Plaquebildung; -, Plaquedurchmesser nicht mehr positiv (< 5 mm); ✠, verendet bei Blutabnahme vor DHT

Tabelle 21b Geschmierte Meerschweinchen der Gruppen B, D und E: Ergebnisse des DHT, ausgedrückt in mm Plaquedurchmesser, ausgelöst durch Hirudin, Eglin b, Bdellin B, SBTI, pNaCl, 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage (jeweils intracutan injiziert)

Ø, keine Plaquebildung

				Hirudin							Eglin b	Bdellin B	SBTI	pNaCl	S.gr.[a]
				[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 ml											
Gruppe	Salbe	Stamm	Tier Nr.	[1:5^0 100µg	1:5^1 20µg	1:5^2 4µg	1:5^3 800ng	1:5^4 160ng	1:5^5 32ng	1:5^6] 6,4ng	80µg	200µg	100µg	0,1ml	0,1ml
B (e)	o.S.	2N♂	260	Ø							Ø	Ø			
	o.S.	2N♀	269	Ø							Ø	Ø			
	S.gr.	2N♂	258	✝											
	S.gr.	2N♂	259	Ø							Ø	Ø			
	500 ATE[b]	↑	243	8	7	5					10	10			
	500 ATE[b]	2N♀	301	10	6						16	13			
	20 000 ATE[c]	|	275	✝											
	20 000 ATE[c]	↓	288	13	12	7					15	13			
D (Z)	500 ATE[b]	↑	277	12	10	8	-				17	15	Ø	Ø	
	500 ATE[b]	13N♂	286	11	8						15	17	Ø	Ø	Ø
	20 000 ATE[c]	|	279	11	10	6	5				18	17	Ø	Ø	
	20 000 ATE[c]	↓	300	14	11	14	8	6	6	5	19	20	Ø	Ø	Ø
E (e)	S.gr.	↑	352	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	
	S.gr.	|	353	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	
	mod.S.gr.	2N♂	350	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	
	mod.S.gr	|	351	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	
	mod.S.gr.	|	354	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	
	mod.S.gr.	↓	355	Ø							Ø	Ø	Ø	Ø	

[a] 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage; [b]/100 g; [c]/40 g; (e), Tiere einzeln gehalten; (Z), Tiere zusammengelebt; ✝, verendet bei Blutabnahme vor DHT

wurde, sich jedoch keine positiven Farbplaques zeigten, das Ergebnis also negativ war. Spalten ohne Zeichen besagen, daß die betreffende Substanz an dem betreffenden Tier nicht getestet wurde (s. Tabelle 21b).
Von den insgesamt 34 Meerschweinchen der Gruppen O, A, B, D und E wurde 18 Tieren Blut abgenommen. 3 Tiere davon verendeten kurz nach der intracardialen Blutentnahme (zur Serumgewinnung für die Bestimmung des PCA-Titers), die mit Ausnahme der Gruppe O jeweils 2 Tage vor der Durchführung des DHT erfolgte.

Alle getesteten Meerschweinchen der Gruppen D und E waren für die Kontrollen SBTI (10 Tiere) und pNaCl (10 Tiere) sowie für die 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage (2 Tiere) negativ.

Alle einzeln gesetzten Tiere der Gruppen B und E, behandelt ohne Salbe (o.S.: n=2), mit Salbengrundlage (S.gr.: n=3) und mit modifizierter Salbengrundlage (mod.S.gr.: n=4), waren negativ für Hirudin, Eglin b und Bdellin B.

Alle einzeln gesetzten Tiere der Gruppe B, geschmiert mit der Salbe 500 ATE/100 g (2 Tiere) und 20 000 ATE/40 g (1 Tier), waren positiv für Hirudin, Eglin b und Bdellin B.

Von den zusammenlebenden Tieren der Gruppen O, A und D waren mit einer Ausnahme alle Tiere, behandelt ohne Salbe (o.S.: n=4), mit Salbengrundlage (S.gr.: n=4) und mit der Salbe 500 ATE/100 g (5 Tiere) positiv für die getestete Substanz Hirudin bzw. Eglin b und Bdellin B. Lediglich 1 Tier, geschmiert mit der Salbe 20 000 ATE/40 g, war negativ für das getestete Hirudin. Alle übrigen geschmierten Tiere der Gruppe mit der hochkonzentrierten Salbe (5 Meerschweinchen) waren positiv für Hirudin bzw. Eglin b und Bdellin B.

Die zusammenlebenden Meerschweinchen der Gruppen O, A und D zeigten gegenüber dem in Verdünnung getesteten Hirudin eine wesentlich empfindlichere Nachweisgrenze als die einzeln gesetzten Tiere der Gruppe B.

Bei den einzeln gesetzten Tieren betrug die Nachweisgrenze für Hirudin 4 µg/0,1 ml. Es bestand dabei kein Unterschied zwischen den Tieren mit der 500 ATE/100 g-Salbe und der 20 000 ATE/40 g-Salbe.

Bei den zusammenlebenden Tieren lag die Nachweisgrenze für Hirudin bei 10 pg/0,1 ml. Dieser Wert fand sich bei Meerschweinchen, die ohne Salbe, mit Salbengrundlage und mit der konzentrierten Salbe behandelt worden waren.

Eine Zusammenstellung der Hirudinnachweisgrenze für die Meerschweinchen-Gruppen, bei denen die Tiere zusammen bzw. einzeln lebten, ist Tabelle 22 zu entnehmen.

Auffallend ist bei den Gruppen B und D, die gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B getestet wurden, daß alle Meerschweinchen mit Eglin b und Bdellin B größere Plaquedurchmesser bildeten als mit Hirudin (jeweils unverdünnte Lösung).

D.1.5.3 Gefütterte Meerschweinchen

Eine Übersicht der Ergebnisse aller an gefütterten Meerschweinchen ausgeführten DHTs ist in Tabelle 23 gegeben. Sie wurde nach denselben Gesichtspunkten wie die Tabellen 21a und 21b (D.1.5.2) angelegt.

Die 10 Meerschweinchen der Gruppen C, F und G wurden alle dem DHT unterzogen.

Alle getesteten Meerschweinchen (Gruppen C, F, G) waren mit den Kontrollen SBTI (10 Tiere) und pNaCl (10 Tiere) sowie den 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage negativ.

Von den 10 Tieren reagierten 8 positiv mit Hirudin, 9 mit Eglin b und 8 mit Bdellin B. Die Nachweisgrenze für Hirudin betrug bei 7 Meerschweinchen 100 µg/0,1 ml und bei einem 20 µg/0,1 ml.

Tabelle 22 Nachweisgrenzen für Hirudin im DHT bei zusammen und einzeln lebenden geschmierten Meerschweinchen

Hirudin: Nachweis-grenze/0,1 ml		Zusammen lebende Tiere				Einzeln gesetzte Tiere				
	Gesamt-zahl	o.S.	S.gr.	500 ATE/100 g	20 000 ATE/40 g	Gesamt-zahl	o.S.	2 S.gr.	500 ATE/100 g	20 000 ATE/40 g
0 g	1				1	9	2	7		
100 µg	1			1		-				
20 µg	3	2		1		1			1	
4 µg	2	1		1		2			1	1
800 ng	3		1	1	1	-				
160 ng	-					-				
32 ng	1			1		-				
6,4 ng	3		1		2	-				
1,3 ng	1				1	-				
260 pg	-					-				
51 pg	1		1			-				
10 pg	3	1	1		1	-				
Summe (Tiere)	19					12				

Tabelle 23 Gefütterte Meerschweinchen: Ergebnisse des DHT, ausgedrückt in mm Plaquedurchmesser, ausgelöst durch Hirudin, Eglin b, Bdellin B, SBTI, pNaCl, 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage (jeweils intracutan injiziert)

Ø, keine Plaquebildung

				Hirudin		Eglin b	Bdellin B	SBTI	pNaCl	S.gr.[a]
				[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 ml						
Gruppe	Salbe/ Brlsg.[e]	Stamm[b]	Tier Nr.	[1:5[o] 100 µg	1:5[1]] 20 µg	80 µg	200 µg	100 µg	0,1 ml	0,1 ml
C (Z)	500 ATE[c]	↑	263	Ø		Ø	Ø	Ø	Ø	
	500 ATE[c]	2N	265	5		12	Ø	Ø	Ø	Ø
	20 000 ATE[d]	|	267	8		7	8	Ø	Ø	
	20 000 ATE[d]	↓	268	10	5	9	18	Ø	Ø	Ø
F (Z)	20 000 ATE[d]	↑	356	Ø		10	10	Ø	Ø	
	20 000 ATE[d]	PW	357	6		8	8	Ø	Ø	
	20 000 ATE[d]	↓	358	5		7	6	Ø	Ø	
G (Z)	Brlsg.[e]	↑	359	5		8	8	Ø	Ø	
	Brlsg.[e]	PW	360	5		8	7	Ø	Ø	
	Brlsg.[e]	↓	361	5		8	7	Ø	Ø	

[a] 6 Einzelsubstanzen der Salbengrundlage; [b] alle Tiere weiblich; [c] /100 g; [d] /40 g;

[e] Blutegelrohextrakt-Lösung (s.C.1.2.3, 14 ATE/Tag/Tier); (Z), Tiere zusammen gelebt

Tabelle 24 Korrelation zwischen oral zugeführter Gesamtdosis an Blutegelrohextrakt, ausgedrückt in ATE, und Plaquegröße, ausgedrückt in mm Durchmesser, beim DHT für Hirudin

Ø, keine Plaquebildung

Gruppe	Tier Nr.	Vorbehandlung	Gesamtdosis (ATE/Tier)	DHT[a] [1:5[0] 100 µg	1:5[1]] 20 µg
C	267	20 000 ATE/40 g	12 000	8	
	268	20 000 ATE/40 g	12 000	10	5
	263	500 ATE/100 g	295	Ø	
	265	500 ATE/100 g	295	5	
F	356	20 000 ATE/40 g	210	Ø	
	357	20 000 ATE/40 g	210	6	
	358	20 000 ATE/40 g	210	5	
G	359	Brlsg.[b]	200	5	
	360	Brlsg.[b]	200	5	
	361	Brlsg.[b]	200	5	

[a] Dosierung/0,1 ml bei entsprechender [Verdünnung] im DHT

[b] Blutegelrohextrakt-Lösung

Es bestand eine Korrelation zwischen der oral zugeführten Dosis an Blutegelrohextrakt, ausgedrückt in ATE, und dem Plaquedurchmesser sowie der Nachweisgrenze für Hirudin (s. Tabelle 24). Je mehr Wirkstoff zugeführt wurde, desto eher war der DHT positiv.
Von den 10 Meerschweinchen erhielten 8 eine Gesamtdosis zwischen 200 und 300 ATE. Der DHT fiel bei diesen 8 Tieren 2mal negativ aus und 5mal lag er mit 5 mm Plaquedurchmesser an der Grenze zur positiven Bewertung. Dabei war es unerheblich, ob die Wirkstoffdosis als Salbe oder als Lösung verabreicht worden war.
Erwartungsgemäß ergaben sich bei den 2 Meerschweinchen mit der 60fachen Dosis (12 000 ATE) etwas größere Plaquedurchmesser, einmal lag die Nachweisgrenze bei 20 µg/0,1 ml.

Auch die gefütterten Meerschweinchen zeigten im DHT für Eglin b und Bdellin B bei den unverdünnten Lösungen durchwegs größere Plaquedurchmesser als für Hirudin.

D.1.5.4 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen

Eine Übersicht der Ergebnisse der an intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen ausgeführten DHTs gibt Tabelle 25.
Von den 8 Meerschweinchen der Gruppe 1 wurden 7 im DHT getestet; 6 davon sind in Tabelle 25 aufgeführt, das Ergebnis des 7. Tieres ist in Abschnitt D.1.5.5 nachzulesen. Das Meerschweinchen Nr. 241 der Gruppe 1 verendete kurz nach der intracardialen Blutentnahme (Serumgewinnung zum Zweck der PCA-Titer-Bestimmung) und konnte für den DHT nicht mehr verwendet werden.
Die Tiere der Kontrollgruppen 2 und 3 (je 2 Meerschweinchen) wurden dem DHT nicht unterzogen. Sie sind deshalb nicht in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen[a]: Ergebnisse des DHT, ausgedrückt in mm Plaquedurchmesser, ausgelöst durch Hirudin, Eglin b, Bdellin B, SBTI, pNaCl (jeweils intracutan injiziert)

Ø, keine Plaquebildung

			Hirudin												Eglin b	Bdellin B	SBTI	pNaCl
			[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 m.															
Gruppe	Stamm	Tier Nr.	[1:5^0 100µg	1:5^1 20µg	1:5^2 4µg	1:5^3 800ng	1:5^4 160ng	1:5^5 32ng	1:5^6 6,4ng	1:5^7 1,3ng	1:5^8 256pg	1:5^9 51pg	1:5^{10} 10pg	1:5^{11} 2pg	1:5^{12}] 0,4pg	80µg	200µg	100µg	0,1ml
-	PW♂	229	20	16	13	11	10	9	7	6	5					20	14	Ø	Ø
	PW♂	232	20	17	16	14	13	12	10	9	8	7	6	5	-	20	14	Ø	Ø
			Eglin b													Hirudin	Bdellin B	SBTI	pNaCl
			[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 ml																
Gruppe	Stamm	Tier Nr.	[1:5^0 80µg	1:5^1 16µg	1:5^2 3,2µg	1:5^3] 640ng										100µg	200µg	100µg	0,1ml
1	PW♂	272	12	10	9	7										15	12	Ø	Ø
	PW♀	285	Ø													Ø	Ø	Ø	Ø
			Bdellin B													Hirudin	Eglin b	SBTI	pNaCl
			[Verdünnung] bzw. Dosierung/0,1 ml																
Gruppe	Stamm	Tier Nr.	[1:5^0 200µg	1:5^1 40µg	1:5^2 8µg	1:5^3] 1,6µg										100µg	80µg	100µg	0,1ml
1	PW♂	231	15	14	8	5										18	22	Ø	Ø
	PW♀	284	16	13	6											19	17	Ø	Ø

[a] mit Blutegelrohextraktlösung (s.C.1.3); -, Plaquedurchmesser nicht mehr positiv (< 5 mm); PW♀ 241 → verendet bei Blutabnahme vor DHT; PW♂ 362 → DHT s. D. 1.5.5

Im Unterschied zu den DHTs an den geschmierten und gefütterten Meerschweinchen wurden bei den intraperitoneal immunisierten Tieren nicht nur Hirudin, sondern auch Eglin b und Bdellin B in 5er-Schritt-Verdünnungsreihen gespritzt, maximal bis zur Verdünnung $1:5^{12}$. 2 Meerschweinchen erhielten jeweils einen dieser Blutegelinhibitoren in Verdünnung intracutan appliziert, die beiden anderen Inhibitoren als unverdünnte Ausgangslösung sowie zusätzlich als Kontrollen SBTI und pNaCl. Beim Tier Nr. 229 wurde nur Hirudin in Verdünnung getestet.

Bei allen getesteten Meerschweinchen fielen die Kontrollen SBTI (5 Tiere) und pNaCl (5 Tiere) negativ aus. Von den 6 Tieren war eines (Nr. 285) negativ für Hirudin, Eglin b und Bdellin B, während die anderen 5 Meerschweinchen mit allen getesteten Blutegelinhibitoren positiv reagierten.

Die Nachweisgrenze für Hirudin lag bei 2 pg/0,1 ml, für Eglin b bei 640 ng/0,1 ml und für Bdellin B bei 1,6 µg/0,1 ml. Abbildung 6a zeigt einen positiven DHT.

D.1.5.5 Nachweis von freien Blutegelwirkstoffen im Serum geschmierter Meerschweinchen

Einem intraperitoneal mit vorgereinigtem, dialysiertem Blutegelrohextrakt immunisierten Meerschweinchen der Gruppe 1 (Nr. 362) wurden das Kontrollserum eines neutralen Meerschweinchens sowie die 6 Serumproben der 2 Tiere der Gruppe H (Blutabnahme nach unterschiedlichen Zeitabständen nach der Schmierung; s. C.1.4.4 und C.3.1.1) intracutan in die Rückenhaut injiziert und dann der DHT ausgelöst.

Das Ergebnis dieses DHT ist Tabelle 26 und Abbildung 7 zu entnehmen.

Abb. 6a Positiver DHT. Meerschweinchen Nr. 232 (Gruppe 1) intraperitoneal immunisiert. DHT für Hirudin, positiv bis Verdünnung $1:5^{11}$, für Eglin b, unverdünnt und Bdellin B, unverdünnt (vgl. Tabelle 25).

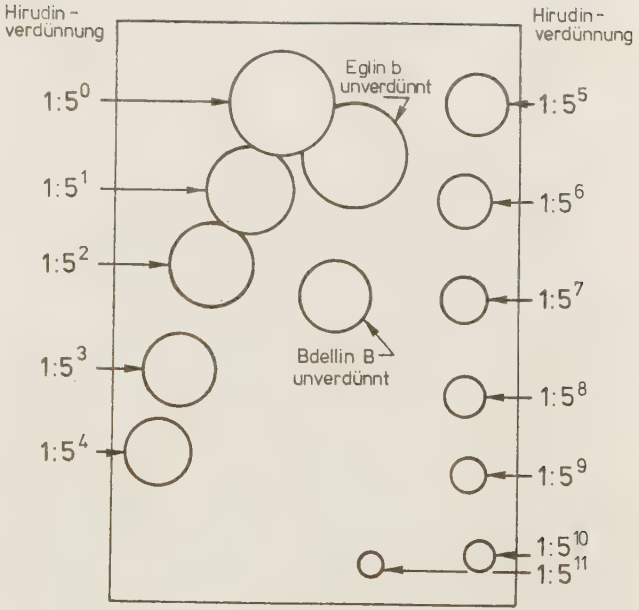


Abb. 6b Zuordnung des positiven Plaques von Abb. 6a.

Tabelle 26 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen: DHT ausgelöst durch intracutane Injektion von Serumproben (unverdünnt, je 0,1 ml) geschmierter Meerschweinchen

Geschmierte Tiere		DHT[b]
Gruppe H[a] Tier Nr.	Zeitpunkt der Blutabnahme nach Schmierung (min)	Plaques (mm Durchmesser)
376	35	10
376	45	12
377	50	13
377	55	15
376	80	15
377	90	12
Kontrollserum		Ø

[a] beide Tiere Stamm PWo

[b] Tier: Gruppe 1, Stamm PWo, Nr. 362

Ø, keine Plaquebildung

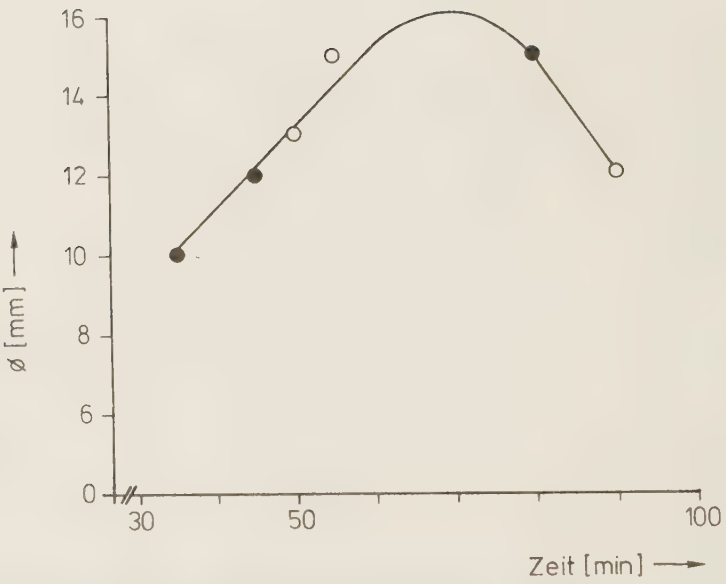


Abb. 7 Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Meerschweinchenseren mittels DHT
Ordinate: Plaquedurchmesser (Ø) in mm
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme nach Schmierung der Tiere mit Blutegelwirkstoffen
• Tier Nr. 376
o Tier Nr. 377

Das Meerschweinchen Nr. 362 war für das Kontrollserum negativ, reagierte aber mit allen 6 Serumproben der geschmierten Tiere positiv. Dabei ergaben sich unterschiedlich große Plaquedurchmesser für die nach unterschiedlichen Zeitabständen nach Schmierung gewonnenen und getesteten Seren.

Diese 2 Parameter (Zeit; Durchmesser) sind in Abbildung 7 graphisch gegeneinander aufgetragen.

D.1.6 Passive Cutane Anaphylaxie

D.1.6.1 Geschmierte Meerschweinchen

Eine Übersicht über die Ergebnisse aller mit den Seren von geschmierten Meerschweinchen durchgeführten PCA-Tests findet sich in den Tabellen 27a und 27b.

Tabelle 27b PCA-Test und Titer-Bestimmung mit dem Serumpool O geschmierter Meerschweinchen, bestehend aus den 4 für Hirudin positiven Seren (Nrn. 255, 282, 243, 275) der Gruppen A und B (s. Tabelle 27a), ausgelöst durch Hirudin (intravenös injiziert).

Serum	Verdünnung (je 0,1 ml)	1:1	1:2	1:4	1:8	PCA-Titer
Pool O	Plaquedurchmesser (mm)	20	15	10	Ø	4

Ø, keine Plaquebildung

Alle Seren sind, soweit nicht anders vermerkt, nur unverdünnt intracutan gespritzt worden. Jedes Serum wurde an 2 verschiedenen Meerschweinchen getestet, und zwar (von einer Ausnahme abgesehen, s. Tabelle 27a) nach einer Sensibilisierungszeit von 72 Stunden (s. S. 53).

Tabelle 27a PCA-Tests mit Seren geschmierter Meerschweinchen (jeweils 0,1 ml), ausgelöst durch Hirudin, Eglin b, Bdellin B, (intravenös injiziert) sowie Vergleich dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen des DHT (s. Tabelle 21a und 21b). Als Maß der PCA-Reaktion dienten die Durchmesser der Farbplaques in mm.

Ø, keine Plaquebildung; +, Ig-Rohfraktion eingesetzt (s.C.3.3)

Gruppe	Salbe	Stamm	Serum von Tier Nr.	Ergebnis im PCA-Test (unverdünnt) Hirudin	Eglin b	Bdellin B (Plaques (mm))	Lagerung der Seren Zeit	Temperatur	Ergebnis im DHT (unverdünnt) Hirudin	Eglin b	Bdellin B (Plaques (mm))
O (Z)	o.S.	2Nd	202+	Ø					16		
	o.S.	2Nd	246+	Ø					14		
	S.gr.		22+	Ø			5 Monate		16		
	S.gr.	13Nd	227+	Ø				-30°C	16		
	500 ATE[a]		200+	Ø			2 Tage				
	20 000 ATE[b]		100+	15[c] (72 h)			4 Tage		20		
				8 (4 h)							
				10 (erhitzt)							
			100+	Ø			5 Monate	-30°C	20		
A (Z)	o.S.		250	Ø					10		
	o.S.		251	Ø	Ø	Ø			9		
	S.gr.		326	Ø					10		
	S.gr.		349	Ø	Ø	Ø			20		
	500 ATE[a]		254	Ø	Ø	Ø	2 Monate	-80°C	8		
	500 ATE[a]	2Nd	303	Ø					9		
	20 000 ATE[b]		255	14					21		
	20 000 ATE[b]		282	17					Ø		
B (e)	o.S.		260	Ø	Ø	Ø			Ø	Ø	Ø
	S.gr.		258	Ø	Ø						
	500 ATE[a]	2Nd	243	15					8	10	1[illegible]
	20 000 ATE[b]	2Nd	275	42							

(Z), zusammen lebende Tiere; (e), einzeln lebende Tiere;
[a]/100 g; [b]/40 g; [c], 2er-Schritt-Verdünnungen alle negativ

Die angegebenen Zahlenwerte in den Tabellen 27a und b verstehen sich als mm Plaquedurchmesser. Das Zeichen "Ø" bedeutet, daß das Ergebnis des Tests negativ war (keine Plaquebildung). Sofern nicht das Serum des Meerschweinchens gespritzt wurde, sondern dessen Immunglobulinfraktion (s. C.3.3), ist das betreffende Tier mit einem + gekennzeichnet.

Da die Blutentnahme im Zuge der Austestung des betreffenden Meerschweinchens im DHT nach Evans Blau-Injektion erfolgte, war die gewonnene Serumprobe jeweils tiefblau gefärbt. Voruntersuchungen (intracutane Injektion an neutralen Meerschweinchen) mit Evans-Blau-gefärbten Kontrollseren neutraler Tiere ergab, daß sich schon vor der intravenösen Antigengabe in der Haut des Testtieres blaue Plaques mit einem mittleren Durchmesser von 10 mm bildeten. Nach Abtrennung des Farbstoffes durch Fällung der Immunglobuline trat diese Reaktion nicht mehr auf.

Bei allen Tests liefen Kontrollseren von neutralen Meerschweinchen mit. Sie reagierten ausschließlich negativ (keine Plaquebildung). Die Ergebnisse der Kontrollseren wurden deshalb in der Tabelle nicht gesondert aufgeführt.

Von den insgesamt 18 (auf Hirudinantikörper) getesteten Seren waren 5 positiv, von 5 auf Eglinantikörper und von 4 auf Bdellinantikörper getesteten Seren waren alle negativ. Eine Übersicht der 5 positiven Seren zeigt Tabelle 28.

Es fällt auf, daß im Gegensatz zum direkten Hauttest ausschließlich die Seren von denjenigen Meerschweinchen eine positive PCA-Reaktion bewirkten, die mit blutegelextrakthaltigen Salben geschmiert worden waren. Dabei überwiegen eindeutig die Seren der mit der konzentrierten Wirkstoffpräparation behandelten Tiere. Ohne Einfluß ist offensichtlich, ob die Tiere aller Untergruppen einer Hauptgruppe zusammen in einem Käfig lebten (O und A) oder einzeln gehalten wurden (B).

Tabelle 28 PCA-Tests, ausgelöst durch Hirudin: Übersicht der positiven Seren von geschmierten Meerschweinchen. Angabe in mm Plaquedurchmesser.

Gruppe	Salbe	Serum von Tier Nr.	Hirudin (mm)
O	20 000 ATE/40 g	100	15
A	20 000 ATE/40 g	255	14
A	20 000 ATE/40 g	282	17
B	500 ATE/100 g	243	15
B	20 000 ATE/40 g	275	42

Wenn man die positiven PCA-Reaktionen mit der Art der Vorbehandlung der Tiere vergleicht, so ergibt sich folgende Tendenz: je höher der Wirkstoffgehalt der Salbe war, desto ausgeprägter war die PCA-Reaktion (Tabelle 29).

Für die unverdünnten positiven Seren läßt sich außerdem ein PCA-Titer angeben. Dazu wurden wegen Serummangels für Einzelaustestungen die Reste der Seren der Meerschweinchen Nr. 255, 282, 243 und 275 gepoolt (Pool O). Dieser Pool wurde in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe intracutan gespritzt und nach 72 Stunden die PCA-Reaktion mit Hirudin intravenös ausgelöst. Der PCA-Titer betrug 4 (s. Tabelle 27b).

Die Resultate des DHT und PCA-Tests stimmten in 6 Fällen überein, sofern für ein und dieselbe Substanz, nämlich Hirudin, Eglin b und/oder Bdellin B, der DHT und die PCA-Reaktion bei bzw. von ein und demselben Meerschweinchen durchgeführt wurden. Die diesbezügliche Aufstellung zeigt Tabelle 30.

Weiterhin fällt auf, daß das Serum des Tieres Nr. 100 einmal positiv und einmal negativ war. Außerdem reagierte dieses Serum auch beim 4-Stunden-Wert und nach Erhitzung (30 min, 56°C) positiv.

Tabelle 29 Positive PCA-Reaktionen in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Vorbehandlung der Meerschweinchen der Gruppen O, A und B

Vorbehandlung	Anzahl der mit diesen Seren durchgeführten PCA-Tests	davon positive PCA-Tests
o. S.	9	0
S. gr.	8	0
500 ATE/100 g	6	1
20 000 ATE/40 g	4	4

Tabelle 30 Übereinstimmende Ergebnisse bei DHT und PCA-Test. Angaben in Plaquedurchmessern (mm) für die unverdünnten Lösungen.

Ø, keine Plaquebildung

Gruppe	Salbe	Serum/ Tier Nr.	Hirudin		Eglin b		Bdellin B	
			DHT	PCA	DHT	PCA	DHT	PCA
O	20 000 ATE/40 g	100	20	15				
A	20 000 ATE/40 g	255	21	14				
B	o. S.	260	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
B	500 ATE/100 g	243	8	15	10		10	

Eine weitere Besonderheit weist das Serum von Tier Nr. 282 auf: einer positiven PCA-Reaktion stand ein negativer DHT gegenüber.

D.1.6.2 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen

Eine Übersicht über die Ergebnisse aller mit den Seren von intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen durchgeführten PCA-Test gibt Tabelle 31.
Jedes der 7 Seren wurde in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe 3 verschiedenen Meerschweinchen intracutan gespritzt und bei diesen nach 72 Stunden die PCA-Reaktion mit Hirudin, Eglin b und Bdellin B ausgelöst. Von den 7 Seren waren 7 positiv für Hirudin und je 6 für Eglin b und Bdellin B.

Die Aufschlüsselung der gefundenen PCA-Titer sowie deren Streubreite ist Tabelle 32 zu entnehmen, die Verteilung der einzelnen PCA-Titer Tabelle 33.

Die Streuung der PCA-Titer für die verschiedenen Inhibitoren war zwar von gleicher Größenordnung, jedoch wurden für Hirudin wesentlich häufiger höhere Titer gefunden. Bei den 7 getesteten Seren lagen für Hirudin 6 Titer und für Eglin b und Bdellin B je 3 Titer zwischen 32 und 256.

Unterscheidet man die Meerschweinchen nach Alter und Geschlecht (s. Tabelle 34), so lassen die Seren im PCA-Test folgende Tendenz erkennen: weibliche und junge Tiere weisen generell höhere PCA-Titer auf als ältere, häufiger immunisierte und männliche Tiere (s. Tabelle 35).
Hinsichtlich der Titerbreite sind die Werte der PCA-Titer für Hirudin, Eglin b und Bdellin B in Tabelle 32 zusammengefaßt. Für die älteren und männlichen Tiere liegen die PCA-Titer bei höchstens 32, die jüngeren und weiblichen Meerschweinchen weisen bis auf eine Ausnahme Werte von 64 bis 256 auf (vergleiche Tabelle 35).

Tabelle 31 PCA-Reaktion mit Seren intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen[a] (j = Jungtier), ausgelöst durch Hirudin, Eglin b, Bdellin B (intravenös injiziert). Die Zahlenwerte entsprechen den Plaquedurchmessern in mm.

Ø, keine Plaquebildung

Gruppe	Stamm	Serum von Tier Nr.	Antigen i.v.	Plaquedurchmesser in mm bei Serum-Verdünnung 1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1	PW♂	231	Hirudin	22	17							
			Eglin b	35	30	20	15	5				
			Bdellin B	25	20	15	10					
	PW♂	232	Hirudin	20	15	13	10	8	6			
			Eglin b	26	22	15	10	5				
			Bdellin B	25	15	11	5					
	PW♀	241	Hirudin	50	25	20	17	14	11	9	8	
			Eglin b	60	35	30	25	20	18	15	10	7
			Bdellin B	45	30	16	14	12	8	5		
	PW♂	272	Hirudin	35	30	20	15	10	5			
			Eglin b	20	15	10	5					
			Bdellin B	10								
	PW♀	284j	Hirudin	35	25	20	15	13	10	8		
			Eglin b	Ø								
			Bdellin B	Ø								
	PW♀	285j	Hirudin	35	25	20	17	14	12	10	7	
			Eglin b	60	55	50	35	25	20	15	10	8
			Bdellin B	45	30	25	20	18	15	14	12	10
	PW♂	362j	Hirudin	40	35	25	20	17	14	12	8	5
			Eglin b	60	40	25	20	17	15	12	6	
			Bdellin B	35	25	16	14	13	11	10		

[a] mit Blutegelrohextraktlösung (s.C.1.3)

Tabelle 32 PCA-Titer pro Meerschweinchen (j = Jungtier) und Blutegelinhibitor

Tier Nr.	Stamm	Hirudin	Eglin b	Bdellin B
231	PW ♂	2	16	8
232	PW ♂	32	16	8
241	PW ♀	128	256	64
272	PW ♂	32	8	1
284j	PW ♀	64	0	0
285j	PW ♀	128	256	256
362j	PW ♂	256	128	64
Streubreite der PCA-Titer		2 - 256	0 - 256	0 - 256

Tabelle 33 Verteilung der PCA-Titer-Höhe bezüglich Hirudin, Eglin b und Bdellin B

PCA-Titer	Hirudin	Eglin b	Bdellin B
0		1	1
1			1
2	1		
4			
8		1	2
16		2	
32	2		
64	1		2
128	2	1	
256	1	2	1

Tabelle 34 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen und deren Behandlung

	Jungtiere	ältere Tiere
Alter bei Versuchsbeginn	15 Tage	3 Monate
Alter bei Versuchsende	3,5 Monate	9,5 Monate
i. p. Stimulierungen	10	22
Cyclophosphamidinjektionen	3	6
Gesamtdosis pro Tier	700 ATE	1 540 ATE

Tabelle 35 Relation der PCA-Titer (von Tabelle 32) zum Alter und Geschlecht der Meerschweinchen

hoch			niedrig	
Tier Nr.		Titerbreite	Titerbreite	Tier Nr.
241♀	älter	64 - 256	2 - 16	231♂ älter
285♀	jung	128 - 256	8 - 32	232♂ älter
362♂	jung	64 - 256	1 - 32	272♂ älter
284♀	jung	0 - 64		284♀ jung

Die größten Plaquedurchmesser bezüglich der unverdünnten Lösungen fanden sich im PCA-Test durchwegs für Eglin b (s. Tabelle 36).

Eine vergleichende Übersicht der Ergebnisse aller DHTs und PCA-Tests der intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen ist in Tabelle 37 wiedergegeben. Von den insgesamt 8 Tieren der Gruppe 1 können jedoch nur 5 direkt miteinander verglichen werden, da nicht für alle Meerschweinchen beide Tests durchgeführt wurden. 3 (Nr. 231, 232, 272) dieser 5 Meerschweinchen zeigen gleichlaufend positive Resultate bei PCA und DHT, und zwar für alle 3 Blutegelwirkstoffe. Bei den beiden anderen Tieren (Nr. 284, 285) fielen die Reaktionen entgegengesetzt aus: die Blutegelwirkstoffe die im DHT positiv waren, ergaben in der PCA eine negative Reaktion und umgekehrt.

D.1.6.3 Vergleich aller durchgeführten PCA-Reaktionen mit Seren geschmierter und intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen

Tabelle 38 zeigt eine Zusammenstellung aller durchgeführten PCA-Reaktionen.

Abbildung 8 repräsentiert ein Beipiel für die positive PCA-Reaktion.

Tabelle 36 Vergleich der Plaquegröße in mm im PCA-Test für Hirudin, Eglin b und Bdellin B bezüglich der unverdünnten Lösungen (s. Tabelle 31).

Eingekreiste Zahlen bezeichnen den größten Plaquedurchmesser pro Meerschweinchen.

Ø, keine Plaquebildung

Serum von Tier Nr.	Hirudin	Eglin b	Bdellin B
	Plaques (mm)		
231	22	(35)	25
232	20	(26)	25
241	50	(60)	45
272	(35)	20	10
284	(35)	Ø	Ø
285	(35)	(60)	45
362	40	(60)	35

Tabelle 37 Intraperitoneal immuniserte Meerschweinchen: Vergleich der Reaktionen in PCA und DHT

+, Plaquebildung; Ø, keine Plaquebildung

Tier Nr.	PCA-Test			DHT		
	Hirudin	Eglin b	Bdellin B	Hirudin	Eglin b	Bdellin B
229				+		
231	+	+	+	+	+	+
232	+	+	+	+	+	+
241	+	+	+			
272	+	+	+	+	+	+
284	+	Ø	Ø	+	+	+
285	+	+	+	Ø	Ø	Ø
362	+	+	+			

Tabelle 38 Zusammenstellung aller durchgeführter PCA-Tests
pos., positive Reaktion (Plaquebildung)

[a] geschmiert; [b] i. p. immunisiert

		Hirudin		Eglin b		Bdellin B	
Gruppe	Tiere/ Gruppe	Seren getestet	pos.	Seren getestet	pos.	Seren getestet	pos.
O[a]	8	6	1				
A[a]	8	8	2	3	O	3	O
B[a]	8	4	2	2	O	1	O
	Summe	18	5	5	O	4	O
1[b]	8	7	7	7	6	7	6

Abb. 8 Positive PCA-Reaktion
Serum von Meerschweinchen Nr. 231 (Gruppe 1), intraperitoneal immunisiert. PCA ausgelöst durch Eglin b, positiv von unverdünnter Ausgangslösung 1:1 (oberster Plaque) bis Serumverdünnung 1:16 (unterster Plaque, vgl. Tabelle 31).

D.2 Pathologisch-morphologische Untersuchungen

D.2.1 Obduktion

Eine Obduktion wurde bei den beiden Meerschweinchen der Gruppe "orale Kontrolle" und einem Tier der Gruppe A durchgeführt.

Die Tiere der Gruppe "orale Kontrolle" erschienen äußerlich und innerlich mit Ausnahme der Schleimhäute des Magen-Darm-Trakts unauffällig. Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon wiesen bei beiden Tieren eine deutliche und z.T. sehr starke Rötung auf, jedoch ohne Einblutungen in die Mukosa.

Das obduzierte Meerschweinchen Nr. 282 der Gruppe A (II. Schmierung, zusammen lebend) war aus 2 Gründen auffällig: Einmal wies das Tier im Gegensatz zu den anderen, mit der hochkonzentrierten Salbe (20 000 ATE/40 g) geschmierten Tieren, eine verspätete und minimale Hautreaktion in Form einer geringen Rötung ohne Exanthembildung auf. Außerdem reagierte es im DHT gegen Hirudin als einziges der mit blutegelextrakthaltigen Salben geschmierten Meerschweinchen negativ. Neben einer sehr ausgeprägten Abmagerung und einer allgemeinen, besonders im Kopfbereich ausgeprägten Rarefizierung des Fellkleides fielen in erster Linie eine plump vergrößerte und verformete rechte Vorderpfote sowie stark angeschwollene, unförmige vordere Kniegelenke auf. Die Haut war leicht gelblich verfärbt.
Hervorstechende Befunde der inneren Besichtigung: Fettdepots entleert, beide Nebennieren von gleicher Größe wie die normal großen Nieren, Gelenkflächen der beiden vorderen Kniee ausgeprägt arthrotisch, ein etwa erbsgroßer Lymphknoten in der rechten Axilla.
Die übrigen Organe waren makroskopisch unauffällig.

D.2.2 Histologie

- Meerschweinchen der Gruppe "orale Kontrolle":
Für sämtliche histologisch untersuchten Gewebeproben der 2 Meerschweinchen "orale Kontrolle" (s. Tabelle 13) fanden sich regelrechte Organstrukturen ohne Auffälligkeiten.

- Meerschweinchen der Gruppe B, Bauchhaut vor DHT:
Die Bauchhaut des Meerschweinchens Nr. 269, o. S. (s. Tabelle 13), zeigte einen regelrechten Aufbau und war ohne Auffälligkeiten.

Die Epidermis des Tieres Nr. 288, 20 000 ATE/40 g (s. Tabelle 13), wies eine erhebliche Verbreiterung mit Hyper- und Parakeratosen sowie verbreiterten und verlängerten Reteleisten auf. Der Papillarkörper war fibrös verdichtet und zeigte bis in mittlere Schichten des Coriums vermehrtes Bindegewebe.

- Meerschweinchen der Gruppe O, Bauchhaut nach DHT:
Auch die Bauchhaut des Tieres Nr. 205, 500 ATE/100 g (s. Tabelle 13), wies eine Verbreiterung der Epidermis auf mit Hyperkeratosen und verlängerten Reteleisten. Der Papillarkörper erschien unterschiedlich fibrös verdichtet, an einer Stelle mit vermehrtem Bindegewebe bis in mittlere Schichten des Coriums. Insgesamt waren die Veränderungen weniger ausgeprägt als bei Tier Nr. 288, 20 000 ATE/40 g (s.o.).

- Meerschweinchen, Kontrollen (s. Tabelle 13):
-- Plaques, hervorgerufen durch nicht dialysierten, vorgereinigten Blutegelrohextrakt:
72-Stundenreaktion: Histologisch fanden sich in der Rückenhaut der durch nicht dialysierten, vorgereinigten Blutegelrohextrakt hervorgerufenen postiven Plaques (Kontrolle Tier 2, s. Tabelle 13) für die 72-Stundenreaktion Nekrosen der kollagenen Faserbündel des Papillarkörpers und des Coriums, die bis zur Subcutis reichten. Die Epidermis war zentral geschwürig zerfallen. Dort sah man schorfartige Fibrinauflagerungen und zahlreiche

Granulozyten sowie Kerntrümmer davon.
Die quergestreifte Muskulatur des Platysmas (Rücken) zeigte in der Tiefe bereits teilweise abgeräumte Muskelfasernekrosen, wobei die nekrotischen Areale schon durch ein sehr zellreiches junges Bindegewebe ersetzt waren. In allen Schichten fand sich ein wechselnder Gehalt an Granulozyten und Kerntrümmern, wobei im Bereich des Platysmas auch Lymphozyten und Plasmazellen vorhanden waren.

4-Stundenreaktion: Für die Plaques der 4-Stundenreaktion fanden sich Zeichen einer herdförmigen, beginnenden subepidermalen Blasenbildung mit partieller Abhebung des teilweise in den basalen Schichten von Granulozyten durchwanderten Plattenepithels der Epidermis sowie eine sehr ausgeprägte ödematöse Auflockerung des Papillarkörpers mit entzündlicher Infiltration bei Vorherrschen eosinophiler Granulozyten. Die Entzündungszellen durchdrangen das gesamte Corium mit bandförmiger dichterer Anordnung an der Grenze zur quergestreiften Muskulatur bei teilweisem Übergreifen in die Interstitien. Innerhalb der Muskelfaserbündel lagen regellos verteilt Muskeleinzelfaser- und Gruppennekrosen zwischen noch erhaltenen quergestreiften Faserstrukturen. Innerhalb des ödematösen Corium waren weitgestellte Gefäße sowie herdförmig frische Einblutungen zu erkennen.

15-Minutenreaktion: Für die Plaques der 15-Minutenreaktion fanden sich, bei noch erhaltenen Strukturen aller Schichten, lediglich im Gebiet der Muskulatur einzelne Muskelfasern und Muskelfasergruppen mit scholliger Fragmentation der Myofibrillen und unregelmäßiger, teilweise angedeutet bandförmiger Anordnung, zwischen denen leere Sarkoplasmaschläuche lagen, sodaß innerhalb der einzelnen Muskelfasern mottenfraßartige Aufhellungs- und Verdichtungszonen zu erkennen waren. Entzündliche Infiltrate waren nicht faßbar, ebensowenig eine ödematöse Auflockerung von Papillarkörper und Corium.

-- Plaques, hervorgerufen durch dialysierten, vorgereinigten Blutegelrohextrakt:

4-Stundenreaktion: Für die Plaques der 4-Stundenreaktion der durch dialysierten Blutegelrohextrakt hervorgerufenen positiven Rückenhautplaques (Kontrolle Tier 1, s. Tabelle 13) zeigte sich bei geschlossener Epidermis eine ödematöse Auflokkerung des Coriums einschließlich des Papillarkörpers, jedoch weniger ausgeprägt als bei der 4-Stundenreaktion des nicht dialysierten Blutegelrohextrakts. Es fanden sich (Corium, Papillarkörper) bereits zahlreiche ausgewanderte Granulozyten, darunter überwiegend Eosinophile, die immer wieder dichter um weitgestellte Kapillaren lagen und auch zahlreich in deren Lichtungen erschienen. Die Entzündungsfelder nahmen gegen die Tiefe des Coriums hin zu, griffen auf das subcutane Fettgewebe mit ödematös aufgelockerten Septen über und verdichteten sich bandförmig in die Tiefe der Subcutis an der Grenze zur miterfaßten quergestreiften Muskulatur des Playsmas, wobei einzelne entzündliche Infiltrate auch in die Interstitien der oberflächlichen Muselfasern vordrangen. Bei vorherrschender granulozytärer Komponente fanden sich Austritte von Erythrozyten und auch Lymphozyten. Auch im aufgelockerten Bindegewebe zeigten sich perivaskuläre frische Einblutungen. Muskelfasernekrosen waren nicht erkennbar.

- Meerschweinchen der Gruppe O, Rückenhaut-Plaques nach DHT: Beim Meerschweinchen Nr. 205, 500 ATE/100 g (s. Tabelle 13), wurde der DHT (15-Minutenreaktion) einmal mit reinem Hirudin und parallel dazu mit vorgereinigtem Blutegelrohextrakt, jeweils in 5er-Schritt-Verdünnungsreihe ausgelöst.

Für den positiven Plaque, verursacht durch unverdünntes Reinhirudin (100 µg/0,1 ml pNaCl), fanden sich histologisch eine deutliche Verbreiterung der Epidermis mit vermehrter Hyperkeratose und verbreiterten, aber auch verlängerten Papillarleisten, deren basale Schichten etwas vermehrt Kernteilungsfiguren aufwiesen. Die Papillarleisten waren scharf gegen den deutlich fibrös verdichteten Papillarkörper abgesetzt, wobei

sich die Fibrose bis in die Umgebung der Haarbälge erstreckte, ohne tiefere Abschnitte des Coriums zu erfassen. Dieses fibröse Bindegewebe des Papillarkörpers erschien im Gebiet der Läsion bereits fleckförmig ödematös aufgelockert, wobei auch einzelne Granulozyten extravasal zu finden waren. Auch tauchten im schmalen Saum des Fettgewebes der Subcutis perikapillär einige Granulozyten auf. Muskelnekrosen fehlten.

Für den positiven Hautplaque, ausgelöst durch unverdünnten vorgereinigten Blutegelrohextrakt (19 mg/0,1 ml pNaCl), waren herdförmige Hyperkeratosen der Epidermis zu sehen und wiederum verbreiterte, teilweise auch verlängerte Reteleisten sowie eine deutliche fibröse Verdichtung des Papillarkörpers mit vermehrter Fibrosierung des Bindegewebes um die Haarbälge. Tiefere Schichten blieben dabei ausgespart. Im oberen Papillarkörper fielen eine ödematöse Auflockerung auf und im schmalen Saum des subcutanen Fettgewebes einzelne perikapilläre und perivasale Leukozytenaustritte. Vereinzelte, der Subcutis benachbarte Muskelfasern wiesen eine Homogenisierung der Myofibrillen auf mit beginnender bandförmiger Fragmentierung und Vakuolisierung des Sarkoplasmas.

Für den positiven Hautplaque, ausgelöst durch vorgereinigten Blutegelrohextrakt in der Verdünnung 1:625, zeigten sich wiederum verbreiterte Reteleisten sowie eine deutliche Fibrosierung der Papillarkörper. In dem noch an einer Stelle faßbaren Muskelgewebe erschienen noch weitgehend regelrechte Muskelfasern, von denen einzelne jedoch ein unförmig kondensiertes und vakuolisiertes Sarkoplasma aufwiesen.

Eine Rückenhautbiopsie des Meerschweinchens Nr. 000, 500 ATE/100 g (s. Tabelle 13), vor dem DHT ergab bezüglich der Epidermis und des Coriums dieselben Veränderungen wie bei Tier Nr. 205, 500 ATE/100 g (s.o.).

Den Mastzellen der Meerschweinchen-Hautpräparate wurde noch besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Dazu wurden die Zellen pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung im Bereich des Papillar-

körpers ausgezählt. Dabei ergab sich für unbehandelte Tiere ein Mittelwert von 5 Mastzellen pro Gesichtsfeld bei maximal 9 Mastzellen.

Die Haut der geschmierten Meerschweinchen wies demgegenüber eine höhere Anzahl von Mastzellen auf mit einem Mittelwert von 8 und maximal 10 dieser Zellen pro Gesichtsfeld.

D.3 Hämatologische Untersuchungen

D.3.1 Blutgewinnung

Von den insgesamt 26 z.T. mehrfach kardial punktierten Meerschweinchen (Gruppen H und 1) verendeten 4 innerhalb weniger Stunden nach der Punktion, siehe Tabelle 39.

Tabelle 39 Ausfall an Meerschweinchen durch Kardialpunktion

Gruppe	Vorbehandlung	Stamm	Tier Nr.
O	500 ATE/100 g	13N♂	000
B	S. gr.	2N♂	258
B	20 000 ATE/40 g	2N♀	275
1	i. p.[a]	PW♀	241

[a] pro Stimulierungsinjektion 70 ATE/Tier, s. C.1.3

Die Seren dieser Tiere wurden alle in der PCA getestet (s. D.1.6).

Das Blut eines Meerschweinchens (Nr. 377) der geschmierten Gruppe H war 24 Stunden nach Abnahme noch nicht geronnen (50 Minuten-Wert nach Schmierung, s. C.3.1.1 und D.1.5.5).

D.3.2 Quick-Test

Die Thromboplastinzeit wurde bei 5 Kaninchen mehrmals an verschiedenen Tagen bestimmt, siehe Tabelle 40.

Tabelle 40 Beeinflussung des Quickwerts von Kaninchenplasmen durch Blutegelextraktlösung

Kaninchen Nr.	Plasma ohne Zusatz	2 ATE/100 µl Plasma	2,5 ATE/100 µl Plasma	20 µl pNaCl/ 100 µl Plasma
27	100 %	95 %	63 %	100 %
28	100 %	100 %	97 %	100 %
32	100 %	100 %	100 %	100 %
33	100 %	100 %	76 %	100 %
34	100 %	100 %	98 %	100 %
Variations-breite des Quickwerts	100 %	95 % - 100 %	63 % - 100 %	100 %

Die Quickwerte waren reproduzierbar. Werte von 100 % bis 70 % entsprechen der Norm. Damit lagen praktisch alle Werte bis auf eine Ausnahme (63 %, Nr. 27) im Normalbereich.

Durch die Zugabe von pNaCl und Blutegelextraktlösung mit einer Aktivität von 2 bzw. 2,5 ATE/100 µl Plasma wurde der Quickwert nicht beeinflußt. Die Ergebnisse aller mitlaufenden Kontrollplasmen entsprachen dem vom Hersteller angegebenen Kontrollbereich.

D.3.3 Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Die Partielle Thromboplastinzeit wurde bei 7 Kaninchen mehrmals an verschiedenen Tagen bestimmt, siehe Tabelle 41.

Tabelle 41 Bestimmung der PTT (in sec) von Kaninchenplasmen an verschiedenen Tagen

Kaninchen Nr.	1. Blutabnahme	2. Blutabnahme	3. Blutabnahme	4. Blutabnahme
19	30,4	-	-	55,4
26	-	-	33,1	44,8
27	-	26,8	44,2	-
28	-	49,8	35,1	-
32	38,4	42,1	-	-
33	20,1	36,6	-	58,1
34	24,8	51,3	30,6	77,4

Die PTT hat einen Normalbereich von 35 bis 50 Sekunden. Die maximal tolerierte Schwankungsbreite pro Individuum beträgt ± 2 Sekunden. Alle mitlaufenden Kontrollplasmen lagen in dem vom Hersteller angegebenen Normbereich.

Von den 17 erhaltenen Werten entsprachen 10 nicht dem Normbereich der PTT und außerdem ergaben sich für alle 7 Kaninchen große individuelle Schwankungen bis zu 53 Sekunden pro Tier.

Trotzdem wurde für alle Kaninchen die PTT nach Zugabe von je 1,6; 2; 2,5 und 68 ATE bzw. der entsprechenden Menge pNaCl zu 100 µl Plasma bestimmt.
Dabei war zu beobachten, daß die PTT mit steigender ATE-Menge länger wurde, bis zur Ungerinnbarkeit der 7 Plasmen bei Zugabe von 68 ATE/100 µl.

D.3.4 Ig-Rohfraktion

Nach dem Ausfällen und mehrmaligen Waschen der Immunglobuline aus Evans Blau haltigem Serum war zwar immer noch eine schwache Blaufärbung sichtbar; die geringe, in der Ig-Lösung noch vorhandene Farbstoffmenge verursachte jedoch im PCA-Test keine positive Reaktion mehr (s. D.1.6.1).

D.4 Urinuntersuchungen

Der pH lag bei den Kaninchenurinen zwischen 8,5 und 10,5; bei den Meerschweinchenurinen zwischen 8 und 10.

D.4.1 Dialyse

Die dialysierten Urine waren deutlich weniger gelbbraun gefärbt.

D.4.2 Fibrinogen-Clotting-Test

Die Ergebnisse der in den Fibrinogen-Clotting-Test eingesetzten Leerwerturine (Kontrollurine) von Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten sowie vom Menschen sind Tabelle 42 zu entnehmen. Die Urine von Meerschweinchen und Kaninchen wurden mehrmals an verschiedenen Tagen getestet.

Die Urine aller nicht vorbehandelten Individuen (Leerwerturine) bewirkten bereits an sich eine Thrombinhemmung. Die Hemmwerte waren jedoch keineswegs von Tag zu Tag konstant, sondern wiesen eine erhebliche intraindividuelle Schwankungsbreite auf. Bei erneuter Austestung der Leerwerturine nach 8 Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank (-4°C) waren die Werte der Ersttestung reproduzierbar.

Die Ergebnisse des Fibrinogen-Clotting-Tests mit Leerwerturinen sowie mit Urinen, die 6,5; 24 und 28 Stunden nach intraperitonealer Immunisierung von Meerschweinchen mit vorgereinigtem Blutegelrohextrakt gewonnen wurden, zeigt Tabelle 43.
Die mit den nach intraperitonealer Injektion gewonnenen Urinen gefundenen Werte schwankten ebenso uncharakteristisch wie diejenigen der Leerwerturine (s.o.).

Tabelle 42 Fibrinogen-Clotting-Test mit Leerwerturinen von Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten und Mensch. Die gefundenen Hemmaktivitäten sind in ATE/ml Urin angegeben.

Meerschweinchen Nr.	Stamm	Hemmaktivität 1.Tag	2.Tag
202	2N♂	14	
22	13N♂	3	
000	13N♂	3	
99	13N♂	3	
3	PW♀	8	
4	PW♀	3	
5	PW♂	0	
6	PW♂	2	
229	PW♂	6	4
231	PW♂	8	10
232	PW♂	9	12
241	PW♀	2	12
272	PW♂	2	54

Kaninchen Nr.	Hemmaktivität 1.Tag	2.Tag	3.Tag
K19	18	21	48
K26	12	6	9
K32	29	9	27
K33	12	11	11
K34	15	5	7
Ratte Nr.			
R1	2		
R2	14		
R3	4		
R4	18		
R5	4		
Mensch			
M1	25		
M2	32		

Tabelle 43 Fibrinogen-Clotting-Test mit Leerwerturinen sowie Urinen derselben Tiere, gewonnen 6,5; 24 und 28 Stunden nach intraperitonealer Injektion von vorgereinigtem Blutegelrohextrakt (Meerschweinchen Gruppe 1). Die gefundenen Hemmaktivitäten sind in ATE/ml Urin angegeben.

Meerschweinchen Nr.	Stamm	Leerwerturin[a]	1. Immunisierung Urin gewonnen nach 6,5 h	24 h	28 h	Leerwerturin[a]	2. Immunisierung Urin gewonnen nach 6,5 h	24 h	28 h
229	PW♂	6	8	3	7	4		6	6
231	PW♂	8	7	10	10	10	7	5	5
232	PW♂	9	9	8		12	10	26	18
241	PW♀	2	5	11		12	12	12	12
272	PW♂	2	5	7	5	54	17	20	25

[a] vor Immunisierung gewonnen

D.4.3 Chromozym TH-Test I

D.4.3.1 Stabilität des Thrombins

Das Ergebnis der Bestimmung der Leerwertstabilität des Thrombins, getestet im Chromozym TH-Test I über zwei bis drei Stunden, zeigt Abbildung 9.
Die durchschnittliche Ausgangsaktivität des Thrombins im Testsystem betrug 4,63 mU. Diese Aktivität fiel konstant und relativ rasch ab (s. Abbildung 9), während 135 Minuten um rund 37 %.

D.4.3.2 Stabilität des Hirudins im Urin

Bei Zugabe steigender Mengen (bis 30 µl) verschiedener Leerwerturine von Kaninchen und Ratten zum Chromozym TH I-Testsystem stieg die Thrombinaktivität nur geringfügig an und blieb dann nahezu konstant.

Bei Zugabe von blutegelrohextrakthaltigen Kaninchen- und Rattenurinen (bis 30 µl; Aktivität: 1,1 ATE/ml Urin) zum Chromozym TH I-Testsystem ergab sich mit steigender Urinmenge eine zunehmende Hemmung der Thrombinaktivität. Es fand sich jedoch keine lineare Beziehung, d.h. die doppelte Menge Urin bewirkte keine Verdoppelung des Hemmgrades bzw. der Hemmaktivität.
Die Hemmaktivität wurde unmittelbar nach Ansetzen der Urinproben und nach 1,5; 20 und 80 Stunden bestimmt; sie blieb während dieser Zeit konstant.
Nach dem Erhitzen der Blutegelextrakt enthaltenden Urinproben (10 Minuten bei 80°C) fand sich keine Hemmaktivität mehr.

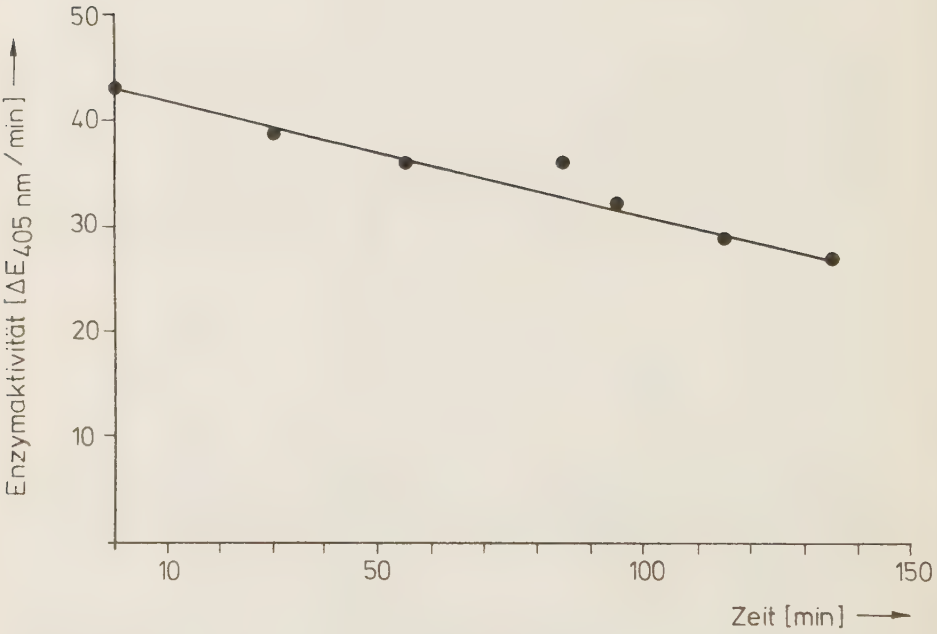


Abb. 9 Leerwertstabilität des Thrombins im Chromozym TH-Test I über 135 Minuten getestet

D.4.3.3 Getestete Urine

Eine Übersicht der Ergebnisse gibt Tabelle 44 wieder.
Bei den Meerschweinchen variierten die Analysenwerte sehr stark und waren z.T. nicht reproduzierbar, d.h. der Urin eines Tieres konnte an einem Tag eine Aktivierung, am anderen eine Hemmung der Thrombinleerwertaktivität bewirken.

D.5 Aktivitätsbestimmungen von Hirudinlösungen

D.5.1 Fibrinogen-Clotting-Test

Das Ergebnis der wöchentlichen Aktivitätsbestimmung von Proben einer dialysierten vorgereinigten Blutegelrohextraktlösung, die zur intraperitonealen Immunisierung der Meerschweinchen der Gruppe 1 verwendet wurden, zeigt Abbildung 10. Zwischen den einzelnen Messungen waren die Proben bei -30°C eingefroren.

Bei allen Proben fiel die Hemmaktivität bereits nach einer Woche relativ stark ab. Der weitere Verlauf war unregelmäßig und wies uncharakteristische Schwankungen auf. Insgesamt ergab sich jedoch die Tendenz einer Aktivitätsabnahme bei Lagerung über einen längeren Zeitraum hinweg.
Die Bestimmung der Hemmaktivität der vorgereinigten Blutegelrohextraktlösung sowie von Urinen mit zugesetztem vorgereinigtem Blutegelrohextrakt vor und nach Dialyse (s. C.1.3) mit dem Fibrinogen-Clotting-Test ergab, daß bei der Dialyse ein durchschnittlicher Verlust der Hemmaktivität von 25 % auftrat.

Die vergleichende Bestimmung der Hemmaktivität von vorgereinigter Blutegelrohextraktlösung sowie von Lösungen mit hochgereinigtem Hirudin, jeweils vor und nach Zugabe von 0,05 % Triton X-100,

Tabelle 44 Mit dem Chromozym TH-Test I getestete Urine von Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten, ohne und mit Zusatz von Blutegelrohextrakt

Tierart	Einfluß der eingesetzten Leerwerturine[a] auf die Thrombinaktivität	Leerwerturine mit Rohextrakt[b] versetzt
Meerschweinchen		
Stamm 13N	unverändert	Aktivierung
Stamm 2N	unverändert oder Aktivierung	Aktivierung
Stamm PW	Hemmung oder Aktivierung	mit steigender Extraktmenge Hemmung oder Aktivierung
Kaninchen	geringe Aktivierung (reproduzierbar)	mit steigender Extraktmenge stark zunehmende Hemmung (reproduzierbar)
Ratten	wie beim Kaninchen	wie beim Kaninchen

[a] 10-30 µl Urin; [b] 10-30 µl Urin; Aktivität jeweils 1,1 ATE/ml Urin

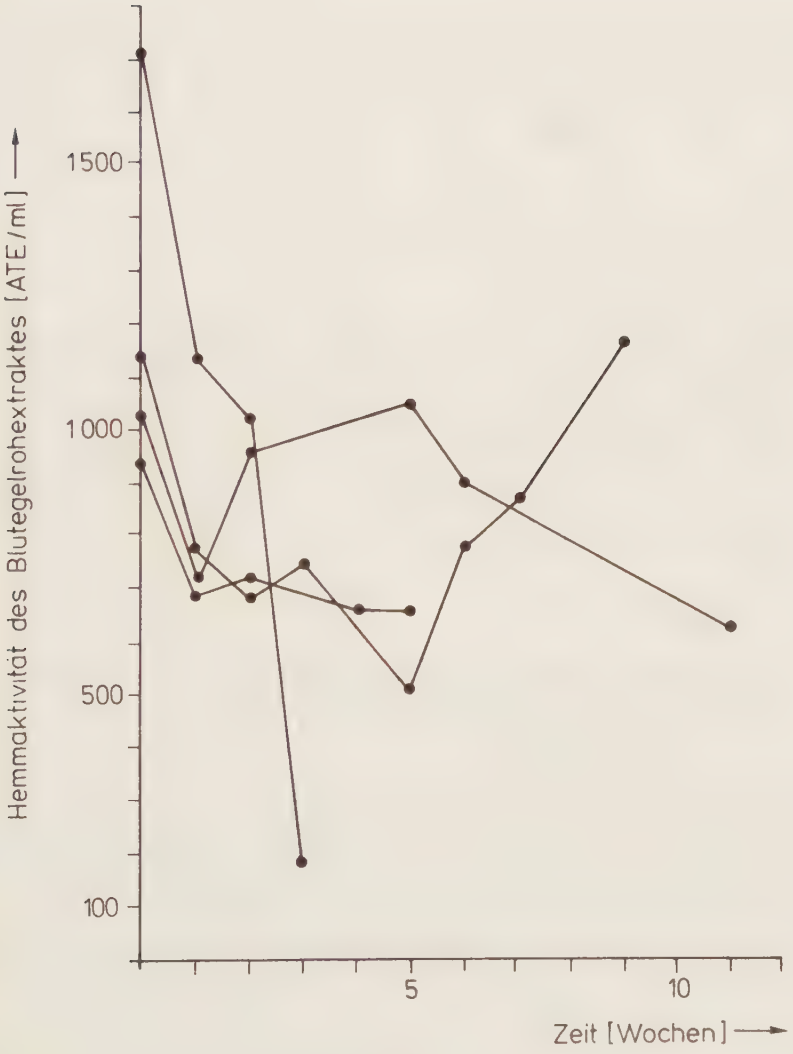


Abb. 10 Verlauf der Hemmaktivität verschiedener Proben dialysierter vorgereinigter Blutegelrohextraktlösung über mehrere Wochen gelagert bei -30°C; pH der Lösung 6,35

ergab stets eine höhere Hemmaktivität für die Triton X-100 enthaltenden Lösungen. Der Aktivitätsunterschied war beim Reinhirudin am deutlichsten.

D.5.2 Chromozym TH-Test II

Wurde dem TRA-Puffer I sowie den Reinhirudinlösungen und deren Verdünnungen kein Triton X-100 zugesetzt, so ergaben sich bei verschiedenen Messungen für ein und dieselbe Probe sehr unterschiedliche Hemmaktivitätswerte. Außerdem lagen diese immer unter den Werten, die nach Zugabe von 0,05 % Triton X-100 erzielt wurden; vgl. oben. Deshalb enthielten alle im Chromozym TH-Test II verwendeten Lösungen 0,05 % Triton X-100.

D.6 Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II

Die Ergebnisse der zur Kontrolle durchgeführten Tests zeigen die Abbildungen 11 bis 14. Es wurden dazu immer dieselben Seren verwendet, nämlich ein normales und ein hitzeinaktiviertes Meerschweinchenserum.

Unter den Bedingungen des Chromozym TH-Test II nimmt die Thrombinaktivität bei steigendem Zusatz von Hirudin kontinuierlich und geradlinig ab (Abb. 11).

Die Thrombinleerwertaktivität wird durch hitzeinaktiviertes Meerschweinchen-Kontrollserum nicht beeinflußt. Normales (aktives) Meerschweinchen-Kontrollserum verursacht eine Abnahme der Thrombinaktivität, deren Abfall mit steigender Serummenge stetig langsamer wird (Abb. 12).

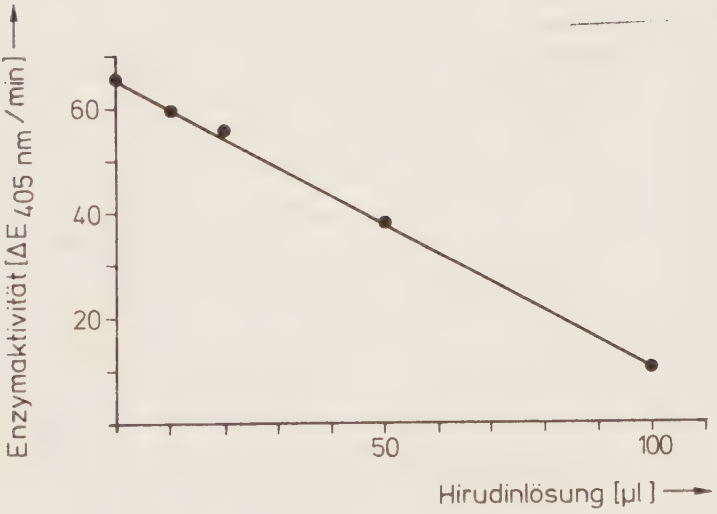


Abb. 11 Chromozym TH-Test II: Hemmung der Thrombinaktivität durch Zugabe steigender Mengen hochgereinigten Hirudins (0,006 ATE/µl)

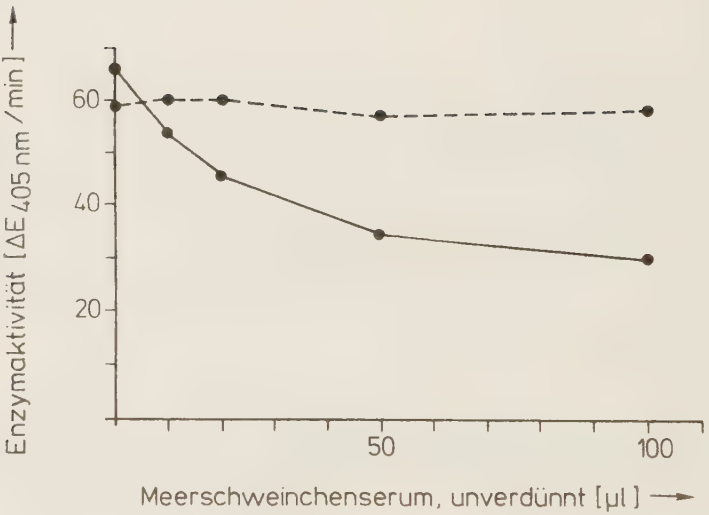


Abb. 12 Chromozym TH-Test II: Beeinflußung der Thrombinaktivität durch steigende Mengen von unverdünntem Meerschweinchenserum, aktiv (●—●) und hitzeinaktiviert (●--●).

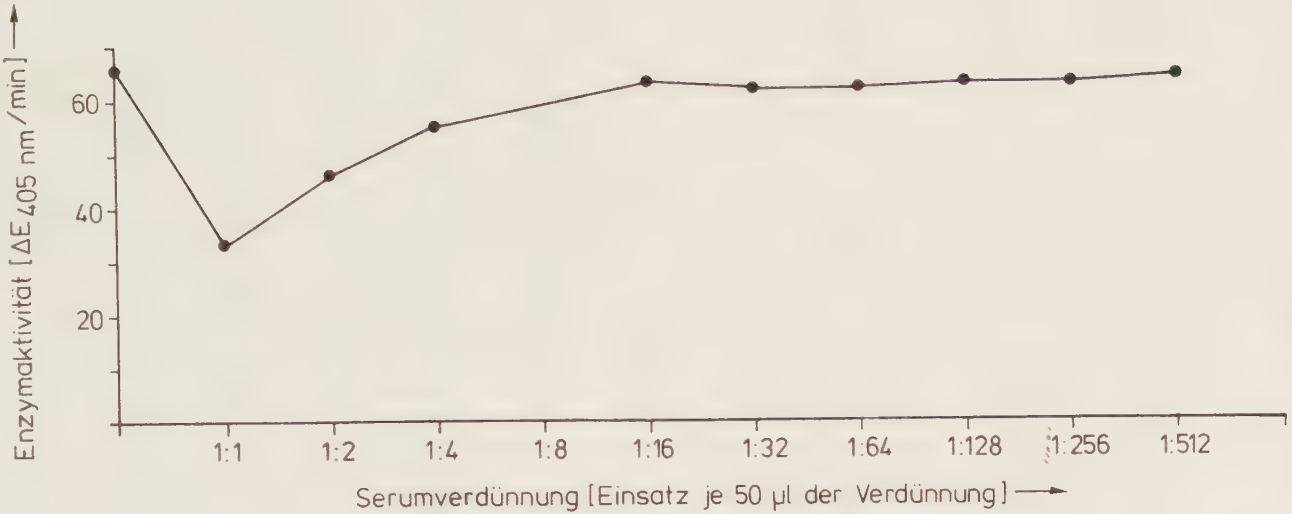


Abb. 13 Chromozym TH-Test II: Beeinflußung der Thrombinaktivität bei Zugabe von aktivem Meerschweinchenserum in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe

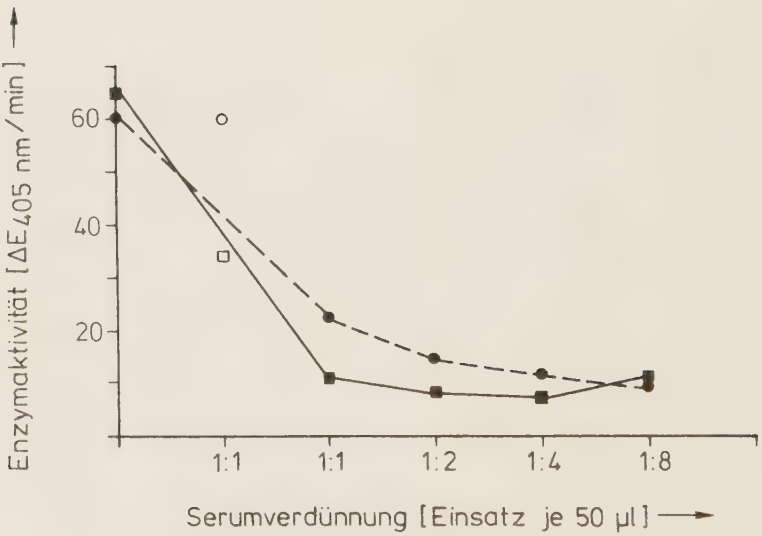


Abb. 14 Chromozym TH-Test II: Beeinflußung der Thrombinaktivität durch aktives (■—□) und hitzeinaktiviertes (●--○) Meerschweinchenserum, zugegeben in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe bei jeweils konstantem Hirudingehalt (gefüllte Symbole;je 100 µl; je 0,6 ATE). Offene Symbole: Meßwerte mit den entsprechenden hirudinfreien Seren.

Wenn man das aktive Meerschweinchenserum in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe in den Test einsetzt (Abb. 13), kommt es beim unverdünnten Serum (50 µl) zu dem schon in Abbildung 12 (aktives Serum, 50 µl) wiedergegebenen Abfall der Thrombinaktivität. Diese nimmt dann mit steigender Serumverdünnung wieder stetig zu, erreicht bei der Verdünnung 1:16 den Ausgangswert und bleibt bei Zugabe noch höherer Serumverdünnungen konstant.

Versetzt man die beiden Seren mit Hirudin (0,6 ATE; s. Abb. 14), so beobachtet man mit steigender Serumverdünnung einen Abfall der Thrombinaktivität, der beim aktiven Kontrollserum rascher erfolgt und stärker ausgeprägt als beim hitzeinaktivierten Kontrollserum ist; das hirudinhaltige aktive Kontrollserum hemmt auch stärker als das entsprechende hirudinfreie Kontrollserum.

	Thrombinaktivität
s. Abb. 14 - aktives Serum, 50 µl mit Hirudinzusatz	11 ΔE/min
s. Abb. 12 - aktives Serum, 50 µl ohne Hirudinzusatz	35 ΔE/min

Alle oben genannten Tests wurden mehrfach durchgeführt. Die Ergebnisse waren stets reproduzierbar.

Die Seren von intraperitoneal mit dialysiertem, vorgereinigtem Blutegelrohextrakt immunisierten Meerschweinchen, die mit diesem Testsystem auf Antikörper gegen Hirudin untersucht wurden, sind in Tabelle 45 zusammengefaßt.

Tabelle 45 Mit dem Chromozym TH-Test II auf Hirudinantikörper getestete Meerschweinchenseren

Der Serumpool setzte sich aus den Seren folgender Tiere zusammen: Nr. 231, 232, 241, 272, 284, 285 und 362.

+, getestet; -, nicht getestet

Meerschweinchen Nr.	1 h Inkubation	5 min Inkubation
231	+	+
241	+	+
284	+	+
285	+	+
362	+	-
Serumpool	-	+

D.6.1 Inkubation von 5 Minuten

Das Ergebnis der Austestung der in Tabelle 45 aufgeführten Seren nach 5 Minuten langer Inkubation von Serum und Hirudinlösung ist in Abbildung 15 dargestellt.

Beim Serumpool entspricht der Kurvenverlauf anfänglich dem der Abbildung 13 mit Wiederanstieg der Thrombinanktivität (2er-Schitt-Verdünnungsreihe eines aktiven Serums ohne Hirudinzugabe). Ab Verdünnung 1:8 fällt sie jedoch rasch ab und liegt bei Verdünnung 1:16 fast schon bei Null.

Beim Serum Nr. 284 entspricht der Kurvenverlauf dem der Abbildung 14 mit einem raschen kontinuierlichen Abfall der Thrombinaktivität (2er-Schritt-Verdünnungsreihe eines aktiven Serums mit konstanter Hirudinzugabe).

Die Seren Nr. 231, 241 und 285 liegen hinsichtlich des Kurvenverlaufs der Thrombinaktivität zwischen den beiden oben genannten, d.h., sie weisen nach dem initial raschen Abfall einen gegenüber dem Serumpool verzögerten Wiederanstieg der Thrombinak-

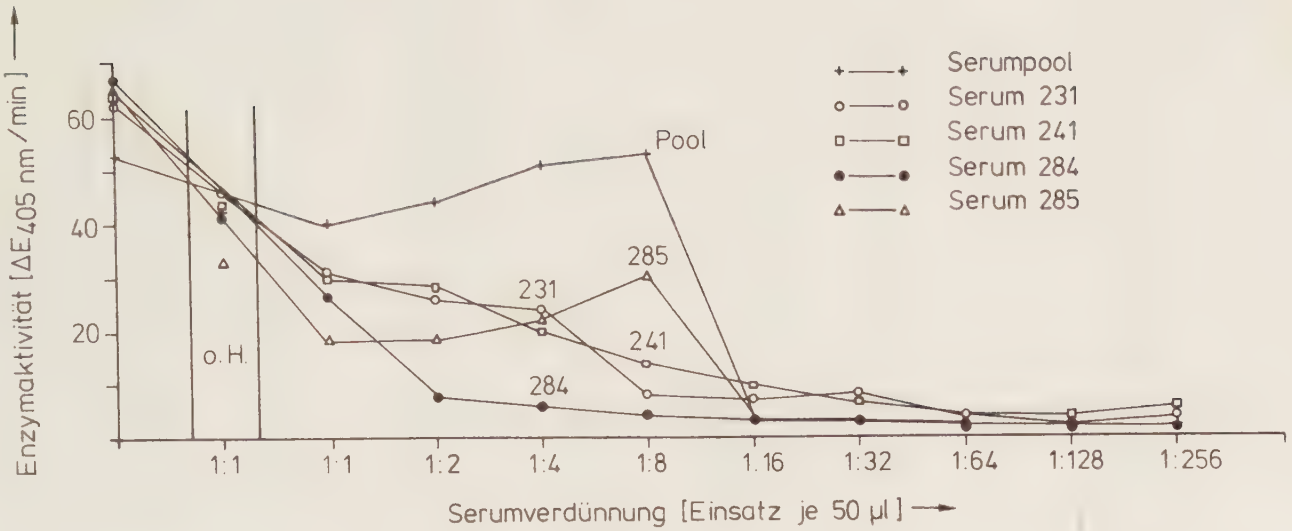


Abb. 15 Chromozym TH-Test II: Beeinflußung der Thrombinaktivität durch Seren intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen. Die Serumproben wurden in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe mit einer jeweils konstanten Hirudinmenge (0,6 ATE, zugegeben in 100 µl) 5 min inkubiert, bevor der Ansatz im Chromozym TH-Test II (mit jeweils konstanter Thrombinmenge) vermessen wurde. o.H., Kontrollwerte ohne Hirudinzusatz.

tivität auf, z.T. unter Bildung eines Aktivitätsplateaus, von welchem dann erst der endgültige Aktivitätsabfall erfolgt.

D.6.2 Inkubation von 1 Stunde

Das Ergebnis der Austestung der in Tabelle 45 aufgeführten Seren nach 1stündiger Inkubation von Serum und Hirudinlösung gibt Abbildung 16 wieder.

Der Verlauf der Thrombinaktivität bei den Seren 231, 241 und 285 entspricht dem Kurvenverlauf der Abbildung 13 bis Serumverdünnung 1:32. Der dann einsetzende Aktivitätsabfall erfolgt relativ langsam und erstreckt sich über mindestens 3 Serumverdünnungen.

Mit Serum Nr. 284 ergab sich ein Abbildung 14 entsprechender Kurvenverlauf mit schnellem, kontinuierlichem Abfall der Thrombinaktivität.

Bei Serum Nr. 362 verläuft die Thrombinaktivitätskurve zwischen den oben genannten, d.h. es kam zur Ausbildung eines geringen Plateaus, von dem aus der verzögerte Aktivitätsabfall beginnt.

D.6.3 Vergleich der bei der Inkubation über 5 Minuten und 1 Stunde erhaltenen Thrombinaktivitätskurven

Serum Nr. 362 und der Serumpool können diesbezüglich nicht verglichen werden, da der Chromozym TH-Test II wegen Serummangels jeweils nur für eine Inkubationszeit durchgeführt wurde.

Serum Nr. 284 bewirkte bei beiden Inkubationszeiten einen ähnlich raschen Abfall der Thrombinaktivität.

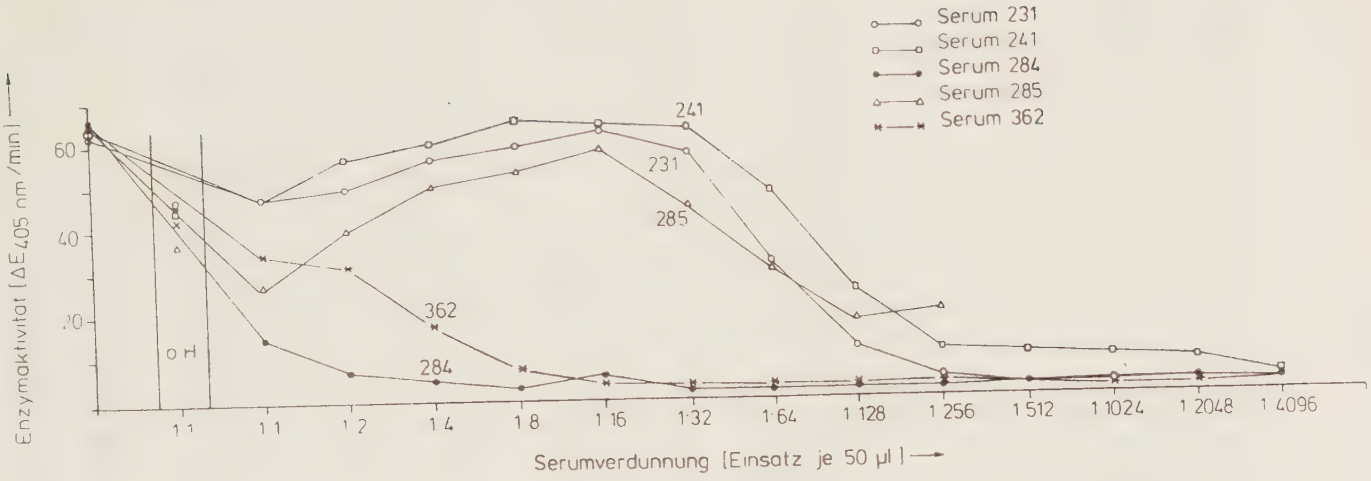


Abb. 16 Chromozym TH-Test II: Beeinflußung der Thrombinaktivität durch Seren intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen. Die Serumproben wurden in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe mit einer jeweils konstanten Hirudinmenge (0,6 ATE, zugegeben in 100 µl) 1 Std. inkubiert, bevor der Ansatz im Chromozym TH-Test II (mit jeweils konstanter Thrombinmenge) vermessen wurde. o.H., Kontrollwerte ohne Hirudinzusatz.

Die Seren Nr. 231, 241 und 285 bewirkten bei derselben Inkubationsdauer jeweils einen ähnlichen Kurvenverlauf der Thrombinaktivität mit einer Verzögerung des Thrombinaktivitätsabfalls. Diese ist nach 1stündiger Inkubation wesentlich stärker ausgeprägt und führt sogar zu einem deutlichen Wiederanstieg der Aktivität bis nahezu auf das Ausgangsniveau unter Ausbildung eines ausgeprägten Plateaus.

Tabelle 46 gibt eine vergleichende Übersicht der an den Meerschweinchen bzw. Seren durchgeführten Tests, bezogen auf Hirudin.

Tabelle 46 Intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen: Vergleichende Übersicht der Resultate aus DHT, PCA und Chromozym TH-Test II, bezogen auf Hirudin

+, positiv; Ø, negativ

Tier Nr.	DHT Plaques (mm)	PCA Titer	Chromozymtest (Titer) 5' inkub.	1 h inkub.
231	18[a]	2	schwach +	++ (32)
241		128	schwach +	++ (32)
284	19[a]	64	Ø	Ø
285	Ø	128	schwach +	++ (16)
362		256		schwach +
Pool			++ (8)	

[a] unverdünnte Lösung

D.7 Immundiffuisonstechniken: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen

D.7.1 Rocket-Immunelektrophorese

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Testreihe enthält Tabelle 47. Die Höhe der Rockets in Millimeter wurde nicht ange-

geben, da die Lage der Rocketspitzen vielfach nicht eindeutig festgelegt werden konnte. Die maximale Rockethöhe lag bei ca. 5 cm. Die am deutlichsten abgrenzbaren Rockets fanden sich für die Urine Nr. 249 und Nr. 5. Es lassen sich somit keine quantitativen sondern allenfalls qualitative Aussagen machen.

Alle Kontrollurine (Leerwerturine) und der Urin des mit blutegelrohextrakthaltiger Salbe gefütterten Meerschweinchens waren negativ.

Die beiden Urine der Tiere der Gruppe B (geschmiert mit 20 000 ATE/40 g) waren positiv auf allen 3 Antikörpergelen.

Die Urine Nr. 249 und Nr. 5 waren erwartungsgemäß positiv für Blutegelrohextrakt und Hirudin, da beide hochgereinigtes Hirudin enthielten, und zwar Urin Nr. 249 3 µg Hirudin (24 ATE in 20 µl Urin) und Urin Nr. 5 1,28 µl Hirudin (10,2 ATE in 20 µl Urin).

Die Abbildungen 17a mit 17c zeigen die positiven Rocket-Immunelektrophoresen.

D.7.2 Radiale Immundiffusion nach Mancini

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Testreihe findet sich in Tabelle 48. Alle Kontrollurine und der Urin des mit blutegelrohextrakthaltiger Salbe gefütterten Meerschweinchens waren negativ.

Die beiden Urine der Tiere der Gruppe B (geschmiert mit 20 000 ATE/40 g) waren positiv, ebenso die Urine Nr. 249 und Nr. 5. Bei Urin Nr. 249 betrug die enthaltene Menge Hirudin 0,75 µg (6 ATE in 5 µl Urin) und bei Urin Nr. 5 0,32 µg (2,55 ATE in 5 µl Urin).

Die bei der radialen Immundiffusion erzielten Ergebnisse entsprechen bei allen getesteten Urinen denen der Rocket-Immunelektrophorese.

Tabelle 47 Rocket-Immunelektrophorese: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen geschmierter Meerschweinchen

+, positiv (Rocket vorhanden); Ø, negativ (Rocket nicht nachweisbar)

Urine[a] Tier Nr.	Vorbehandlung der Tiere	Antikörpergel mit		
		Anti-Blutegel-rohextrakt	Anti-Hirudin	Anti-Eglin
242	Leerwerturin (Kontrollen)	Ø	Ø	Ø
243	Leerwerturin (Kontrollen)	Ø	Ø	Ø
244	Leerwerturin (Kontrollen)	Ø	Ø	Ø
245	Leerwerturin (Kontrollen)	Ø	Ø	Ø
271	Gruppe "orale Kontrolle": 20 000 ATE/40 g	Ø	Ø	Ø
275	Gruppe B: 20 000 ATE/40 g, geschmiert	+	+	+
288	Gruppe B: 20 000 ATE/40 g, geschmiert	+	+	+
249	PCA-Urin (24 ATE/20 µl), hirudinhaltig	+	+	Ø
5	PCA-Urin (10,2 ATE/20 µl), hirudinhaltig	+	+	Ø

[a] Eingesetzte Menge: jeweils 20 µl unverdünnt

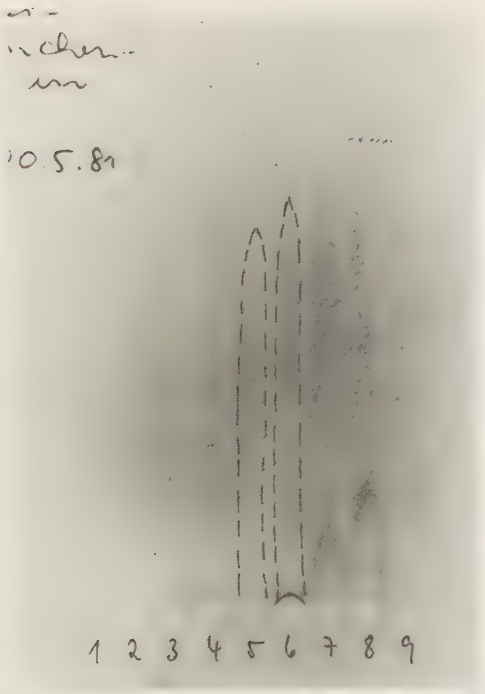


Abb. 17a Rocket-Immunelektrophorese: Nachweis von Hirudin in Urinen geschmierter Meerschweinchen. Antikörpergel mit 2 % Anti-Hirudin IgG. Aufgetragen sind jeweils 20 µl verschiedener, unverdünnter Meerschweinchenurine. (s. auch Tabelle 47)

Nr. 1 mit 4: Tiere Nr. 242 mit 245, Leerwerturine (Kontrollen)
Nr. 5 : Tier Nr. 275, Gruppe B, geschmiert
Nr. 6 : Tier Nr. 288, Gruppe B, geschmiert
Nr. 7 : Tier Nr. 5, PCA-Urin (10,2 ATE/20 µl)
Nr. 8 : Tier Nr. 249, PCA-Urin (24 ATE/20 µl)
Nr. 9 : Tier Nr. 271, Gruppe "orale Kontrolle", gefüttert

Abb. 17b Rocket-Immunelektrophorese: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen geschmierter Meerschweinchen. Antikörpergel mit 2 % Anti-Blutegelrohextrakt IgG. Aufgetragen sind jeweils 20 µl verschiedener unverdünnter Meerschweinchenurine. Zur Nummerierung s. Abb. 17a und Tabelle 47.

Abb. 17c Rocket-Immunelektrophorese: Nachweis von Eglin in Urinen geschmierter Meerschweinchen. Antikörpergel mit 2 % Anti-Eglin IgG.
Aufgetragen sind jeweils 20 µl verschiedener unverdünnter Meerschweinchenurine. Zur Nummerierung s. Abb. 17a und Tabelle 47.

Tabelle 48 Radiale Immundiffusion nach Mancini: Nachweis von Hirudin in Urinen geschmierter Meerschweinchen

+, positiv (Präzipitationsring vorhanden);
Ø, negativ (kein Präzipitat gebildet)

Urine[a] Tier Nr.	Vorbehandlung der Tiere		Antikörpergel mit Anti-Hirudin
242	Leerwerturin	Kontrollen	Ø
243	Leerwerturin		Ø
244	Leerwerturin		Ø
245	Leerwerturin		Ø
271	Gruppe "orale Kontrolle": 20 000 ATE/40 g		Ø
275	Gruppe B: 20 000 ATE/40 g, geschmiert		+
288	Gruppe B: 20 000 ATE/40 g, geschmiert		+
249	PCA-Urin (6 ATE/5 µl), hirudinhaltig		+
5	PCA-Urin (2,55 ATE/5 µl), hirudinhaltig		+

[a] Eingesetzte Menge: jeweils 5 µl unverdünnt

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten Testreihe zeigen Tabelle 49 und Abbildung 18.

Tabelle 49 Radiale Immundiffusion nach Mancini: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen geschmierter Meerschweinchen. Die angegebenen Zahlenwerte stellen die Durchmesser der Präzipitationsringe in mm dar.

-, negativ (kein Präzipitat gebildet)

Urine[a] Tier Nr. (Gruppe O)[b]	Vorbehandlung der Tiere	Durchmesser der Präzipitationsringe im Antikörpergel (mm)			
		Anti-Rohextrakt		Anti-Hirudin	
		1:1[c]	1:10[c]	1:1[c]	1:10[c]
202	o. S.	8	3,6	-	
22	S. gr.	5		6	
000	500 ATE/100 g	4		6	
99	20 000 ATE/40 g	11	4,5	15	6

[a]Eingesetzte Menge: jeweils 5 µl; [b]zusammen lebende Tiere;

[c]Urin unverdünnt (1:1) bzw. 1:10 verdünnt eingesetzt

Alle 4 Urine waren positiv für Blutegelrohextraktantikörper, 2 davon bis Verdünnung 1:10. 3 Urine waren positiv für Hirudinantikörper, einer davon bis Verdünnung 1:10.

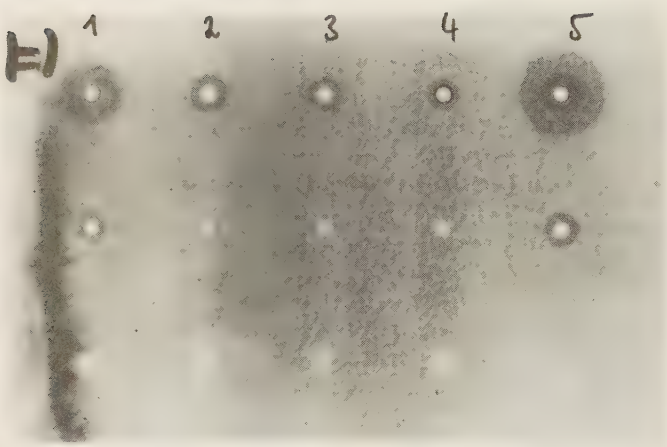


Abb. 18 Radiale Immundiffusion nach Mancini: Nachweis von Blutegelwirkstoffen in Urinen geschmierter Meerschweinchen der Gruppe O. Antikörpergel mit 2 % Anti-Blutegelrohextrakt IgG. Aufgetragen sind jeweils 5 µl verschiedener Meerschweinchenurine (siehe auch Tabelle 49).

Nr. 1: Tier Nr. 202, o.S.
Nr. 2: Tier Nr. 22, S.gr.
Nr. 3: Tier Nr. 000, 500 ATE/100 g
Nr. 4: Tier Nr. 99, 20 000 ATE/40 g[a]
Nr. 5: Tier Nr. 99, 20 000 ATE/40 g[a]

[a]nach unterschiedlichen Zeiten nach Schmierung gesammelter Urin

E DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, am Tiermodell den Nachweis der Resorption von Blutegelwirkstoffen aus Salben durch die intakte Haut zu erbringen sowie die allergene Wirkung von Hirudin, Eglinen und Bdellinen zu untersuchen.
Dabei war zunächst geplant, den Resorptionsnachweis für Hirudin über seine gerinnungshemmende Wirkung im Blut sowie die Ausscheidung in den Urin über Enzymaktivitätsbestimmungen zu führen.
Nachdem diese Methoden aufgrund der Ergebnisse aus Vorversuchen nicht zur Anwendung kommen konnten (s.u.), sollten am Meerschweinchen durch Salbenschmierungen spezifische IgE-Antikörper gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B induziert und diese über cutane Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen werden.

E.1 Zu den tierexperimentellen Untersuchungen

E.1.1 Hauterscheinungen

Bei fast allen Meerschweinchen kam es im Laufe der Salbenschmierungen zu Hautrötungen sowie z.T. zusätzlich zur Ausbildung eines papulösen Exanthems.
Das primäre Auftreten der Hautrötungen am Bauch der Tiere gegenüber Flanken und Rücken dürfte auf die dort stattfindende stärkere mechanische Belastung nach der Scherung sowie eventuell auf die dünner ausgebildete und damit empfindlicher reagierende Bauchhaut zurückzuführen sein.

Das zeitlich erste Auftreten der Hautrötung ist vermutlich von der cutan applizierten Blutegelwirkstoffmenge unabhängig, da gerade auch die einzeln lebenden, mit Salbengrundlage und modifizierter Salbengrundlage (Gruppe E) behandelten Tiere am frühesten reagierten (4. Tag). Am ehesten sind für die Hautrötung deshalb Bestandteile der Salbengrundlage verantwortlich zu machen.

Das Ausmaß der Hautrötungen sowie die zusätzliche Ausbildung des papulösen Exanthems korreliert jedoch mit der applizierten Menge der Salbenwirkstoffe. Je mehr ATE appliziert wurden, desto ausgeprägter waren Rötung und Papelbildung.

Meerschweinchen ohne Salbeneinreibungen von zusammen lebenden Gruppen (besonders die der Gruppe O) wiesen an den Flanken ebenfalls Hautrötungen auf. Dazu ist zu bemerken, daß sich die Tiere speziell der Gruppe O jeweils sehr eng aneinander kuschelten, so daß ein Salben freies Tier mit den beiden mit der 20 000 ATE/40 g-Salbe geschmierten Meerschweinchen zumindest zeitweise in engem Hautkontakt sein konnte. Die Ergebnisse lassen somit auf eine lokale Salbenübertragung bzw. Wirkstoffübertragung durch geschmierte Tiere schließen.
Das positive Ergebnis der DHTs für Hirudin bei den nichtgeschmierten Tieren untermauert zudem die gute Penetrationsfähigkeit des Salbenwirkstoffs Hirudin bzw. seines Anteils mit der antigenen Determinante.

Bei den Meerschweinchen der Gruppe H war bei einer Schmierdauer von 2,5 Tagen die Zeit zur Ausbildung einer Rötung wahrscheinlich zu kurz.

Die Hautrötung sowie Papelbildung können wohl als Irritation der Haut aufgefaßt werden, wobei ursächlich eine allergische und eine toxische Komponente in Frage kommen.

Für eine sensibilisierende Wirkung sprechen die positiven Ergebnisse von DHT und PCA. Auch wurde im Abschnitt C.O (Immunologische Grundlagen zu den Testsystemen) dargelegt, daß das

Meerschweinchen extrem sensibel gegenüber Immunisierungsversuchen reagiert (HABERLAND 1967).

Für eine toxische und gegen eine sensibilisierende Wirkung spricht die Tatsache, daß die Hauterscheinungen mit zunehmender Schmierdauer zwar langsam zunahmen, nach einiger Zeit aber wieder abklangen, z.T. ganz verschwanden und dann nicht mehr auftraten. Bei einer Allergisierung hätten die Hautreaktionen im Laufe der Behandlung an Stärke zunehmen müssen. Die einzige Möglichkeit einer Erklärung für die Abnahme der Hauterscheinungen läge dann in der Annahme einer Desensibilisierung, d.h. in einer Erhöhung der Menge des spezifischen IgG-Anteils zu Ungunsten von IgE-Antikörpern. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß über ein und dieselbe Applikationsform (Salbe, Haut) einmal mehr die IgE-Synthese und das andere Mal die IgG-Synthese stimuliert wird. Zudem gelingt eine Desensibilisierung, wenn überhaupt, nur im Rahmen sehr langer Zeiträume, zumindest beim Menschen (OPRÉE 1979).

Auch die lokale Rötung an den Flanken der nicht geschmierten Tiere der zusammen lebenden Gruppe O, sowie der mit zunehmender Schmierdauer immer spärlicher werdende Haarwuchs an der Bauchseite der geschmierten Meerschweinchen sprechen für eine toxische Wirkung, an die sich die empfindliche Meerschweinchenhaut im Laufe der Versuchszeit offensichtlich adaptiert hat. Einen Hinweis dafür liefern auch die histologisch beobachtbaren Veränderungen (z.B. Hyperkeratosen) in der Haut der geschmierten Tiere.

Ob durch die entzündlich veränderte Haut zumindest zeitweise eine bessere Resorption der Blutegelwirkstoffe möglich war, wurde nicht überprüft, ist jedoch denkbar (ORFANOS 1981; ZESCH 1981; WAHLBERG 1973).

E.1.2 Gewichtsentwicklung

Die gefütterten und intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen nahmen kontinuierlich an Gewicht zu, während das der geschmierten Tiere stetig abnahm.
Für den Gewichtsverlust der geschmierten, geschorenen Meerschweinchen kommen mehrere Faktoren in Betracht:

- der täglich 3malige Streß durch die Manipulation beim Schmieren
- ein mit der Schur verbundener Wärmeverlust, der nicht durch vermehrtes Fressen kompensiert werden konnte
- eine vermehrte Wärmeabgabe über die hyperämisierte, entzündlich veränderte Haut
- ein Krankheitsgefühl, wodurch evtl. die Nahrungsaufnahme geringer war (die geschmierten Meerschweinchen waren jedoch in ihrem Freßverhalten unauffällig)
- eine genetisch bedingte stärkere Anfälligkeit der Stämme 13N und 2N im Vergleich zu PW gegenüber den Versuchsbedingungen.

Welcher dieser Faktoren bei der Gewichtsabnahme besonders wirksam ist, kann derzeit nicht beurteilt werden.

E.1.3 Direkter Hauttest

Ursachen der spezifischen Plaquebildung

Das Zustandekommen der Plaques beim DHT bzw. der PCA-Reaktion läßt sich bis heute noch nicht vollständig erklären (BRANDIS H. 1975). Vermutlich erfolgt durch eine lokale Reaktion des Antigens mit den zellgebundenen Antikörpern (IgE, IgG) eine Aktivierung der Mastzellmembran mit nachfolgender Ausschüttung vasoaktiver, d.h. vasodilatierender Substanzen wie z.B. Histamin aus den basophilen Granula. Dadurch kommt es zu einer lokalen

Weitstellung und zu einer partiellen Durchlässigkeitssteigerung dieser Hautgefäße. Somit kann ein Übertritt des überwiegend an Albumin gebundenen Evans Blau in das Interstitium erfolgen.
Ebenso könnten Proteinasen, die lokal aus Mastzellgranula freigesetzt werden, mitverantwortlich sein für eine gesteigerte Kapillarpermeabilität und Ödembildung, da die Injektion von Chymotrypsin und Trypsin dieselben Effekte verursacht (LAGUNOFF und BENDITT 1963). In Mastzellen von Mensch und Hund wurden trypsinähnliche Enzyme nachgewiesen (GLENNER und COHEN 1960; GLENNER et al. 1962; LAGUNOFF et al. 1962). In Mastzellen von Mensch und Ratte fand man auch Chymase, eine chymotrypsinähnliche Protease (WASSERMAN 1979).

Die Histaminausschüttung ist kein Alles-oder-Nichts-Ereignis, sondern in gewissem Umfang abhängig von der Anzahl der mit IgE-Antikörpern besetzten Mastzellrezeptoren (KULCZYCKI 1981). Die Rezeptorenzahl beträgt für eine Rattenmastzelle ca. 300 000 (CONRAD et al. 1975), für einen menschlichen basophilen Granulozyten 40 000 bis 100 000 (ISHIZAKA et al. 1973) und für eine basophile Leukämiezelle von Ratten 300 000 bis 1 400 000 (KULCZYCKI und METZGER 1974). Unter der Voraussetzung, daß die Anzahl der gebundenen IgE-Antikörper mit der Anzahl der gebildeten IgE-Antikörper positiv korreliert, entspricht ein hoher Immunisierungsgrad einer starken Histaminausschüttung und ein niedriger Immunisierungsgrad einer geringen Histaminausschüttung. Die unterschiedliche Größe und Farbintensität der Plaques würde demnach mit dem unterschiedlichen Immunisierungsgrad bzw. Antikörpertiter des Tieres, d.h. mit der Anzahl der an Mastzellen gebundenen IgE-Antikörper korrelieren.

Bei der Ausführung der DHTs wurde streng darauf geachtet, daß nur Meerschweinchen mit intakter Haut zur Testung kamen. Dies ist insofern von Bedeutung, da jede frische Verletzung oder auch der Anstich eines Blutgefäßes durch den Serumaustritt zu einer positiven Evans Blau-Reaktion (Plaquebildung) führt.

Unspezifische Plaquebildung und Leerwertkontrollen

Die Leerwertprüfung ergab für verschiedene Substanzen ein positives Ergebnis (s. Tabelle 20). Sie konnten somit im DHT nicht eingesetzt werden.
Als Erklärungsmöglichkeit für die positiven Leerwertergebnisse bieten sich folgende Überlegungen an:
Die dickflüssigen Substanzen (Alu Gel S, Salbengrundlagen) wurden unter relativ hohem Druck intracutan injiziert. Dies kann zur mechanischen Zerstörung von Zellmembranen und eventuell kleinsten Gefäßen mit nachfolgendem Farbstoffaustritt in Plaqueform geführt haben.
Die Lösungen mit hohen Salzkonzentrationen (NaCl-Lösung, 5-20 %) sowie Substanzen mit eventuell höherem Salzanteil (z.B. als Verunreinigung bei vorgereinigtem Blutegelrohextrakt und BBI) könnten über eine osmotisch bedingte Zellzerstörung mit nachfolgendem Farbstoffaustritt gewirkt haben. Bekannt ist eine Plaquebildung bei Anwendung organischer Lösungsmittel (z.B. Chloroform, BECK et al. 1980), die vielleicht über eine Zerstörung der Plasmamembranen zum Farbstoffaustritt führen.
Bei eigenen Versuchen ergaben sich positive Leerwerte auch für 99,8 %iges Äthanol.

Zur Kontrolle einer unspezifischen Plaquebildung bzw. überschiessenden Reaktion der Haut auf Evans Blau im DHT und bei der PCA wurde ein Fremdprotein von relativ kleinem Molekulargewicht gewählt, der Trypsininhibitor aus Sojabohnen SBTI (Kunitz), sowie zusätzlich sterile pNaCl-Lösung. Sämtliche Tests verliefen negativ. Damit war eine unspezifische Hautreaktion gegenüber dem Farbstoff ausgeschlossen.

Gegen die 6 getesteten Einzelsubstanzen der S a l b e n g r u n d l a g e bildeten sich keine Antikörper (s. Tabellen 21b und 23). Allerdings wurde dies nur an 4 Meerschweinchen (2x geschmiert, 2x oral) überprüft, so daß das Ergebnis noch nicht als repräsentativ angesehen werden kann.

Immunisierung durch Hautkontakt

Als nach Austestung der Gruppe O im DHT die Meerschweinchen aller Untergruppen eine Antikörperbildung gegen Hirudin aufwiesen, also auch die nicht und die nur mit Salbengrundlage geschmierten Tiere (s. Tabelle 21a), entschlossen wir uns, den Versuch zu wiederholen sowie zusätzlich eine Gruppe (B) aufzunehmen, in der jedes Meerschweinchen einzeln, d.h. ohne jeglichen Kontakt zu anderen Tieren gehalten wurde.

Bei allen e i n z e l n lebenden Tieren, die ohne Salbe und mit Salbengrundlagen behandelt worden waren, ließen sich im DHT keine Antikörper gegen die getesteten Blutegelwirkstoffe nachweisen (s. Tabelle 21b). Somit sprechen die positiven DHTs der Meerschweinchen "ohne Salbe und mit Salbengrundlage" der zusammen lebenden Gruppen (Kontakt der Tiere aller Untergruppen untereinander) für eine Antikörperbildung und damit für eine Penetration der Blutegelwirkstoffe d u r c h d i e H a u t. Dies ist insofern besonders interessant, als diese Tiere "ohne Salbe und mit Salbengrundlage" nicht direkt mit den Blutegelwirkstoffen behandelt wurden. Eine orale Übertragung der Blutegelwirkstoffe kommt praktisch nicht in Betracht, da sich die Tiere n i c h t g e g e n s e i t i g putzten (leckten). Sie konnten die Wirkstoffe praktisch nur über den Hautkontakt mit anderen Tieren aufgenommen haben. Das aber würde bedeuten, daß zumindest Hirudin, ein "Miniprotein" mit einem Molekulargewicht um 7 000, die Haut relativ leicht penetriert.

Besonders aufgefallen ist das Ergebnis des DHTs bei Meerscheinchen Nr. 246 aus der zusammen lebenden Gruppe O (ohne Salbe). Es wurde als letztes Tier dieser Gruppe getestet, nachdem es noch 1 Woche allein, also ohne Kontakt zu hirudingeschmierten Tieren im Käfig gesessen hatte. Sogar nach dieser Zeit zeigte sich im DHT für Hirudin eine positive Reaktion bis zur Verdünnung 20 µg Hirudin/0,1 ml. Die positive Plaquebildung nach einer Latenz von 8 Tagen ohne Kontakt zu geschmierten Tieren

spricht für die Bildung primär zellständiger IgE-Antikörper gegen Hirudin (OVARY et al. 1976).

Immunisierung mittels Schmierung und Nachweisempfindlichkeit (s. Tabellen 21a und 21b)

Alle einzeln lebenden Meerschweinchen, die mit Wirkstoff enthaltenden Salben cutan behandelt worden waren, wiesen eine Antikörperbildung gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B auf, was wiederum für eine Resorption dieser Inhibitoren spricht.

Von den 19 geschmierten Meerschweinchen der zusammen lebenden Gruppen waren 18 Tiere positiv für alle getesteten Wirkstoffe (Hirudin, Eglin b, Bdellin B), und zwar unabhängig davon, welcher Untergruppe sie angehörten ("o.S., S.gr., 500 ATE/100 g, 20 000 ATE/40 g"). Durch den engen Hautkontakt, den die Tiere gewöhnlich untereinander hatten, ist eine Übertragung von Salbenresten bzw. Wirkstoffen auf nicht behandelte Tiere denkbar.

Die Nachweisempfindlichkeit für Hirudin im DHT bei den geschmierten Gruppen war offensichtlich nicht von der cutan applizierten ATE-Menge abhängig, da sich der optimalste Wert von 10 pg Hirudin/0,1 ml bei den zusammen lebenden Tieren für Meerschweinchen behandelt ohne Salbe, mit Salbengrundlage und mit der konzentrierten Salbe fand (s. Tabelle 21a).

Keine Erklärung können wir zur Zeit für folgende Beobachtung geben: Die einzeln lebenden Meerschweinchen der Gruppe B (500 ATE/100 g, 20 000 ATE/40 g) zeigten im Vergleich zu den Tieren der zusammen lebenden Gruppen O, A und D eine wesentlich geringere Nachweisempfindlichkeit für Hirudin, obwohl sie mengenmäßig ebensoviel Wirkstoffe in ATE erhalten hatten und von demselben genetischen Stamm waren (vgl. Tabellen 4 und 5).

Der meist kleinere Plaquedurchmesser für Hirudin bei der unverdünnten Lösung, verglichen mit den Farbplaques für Eglin b und Bdellin B (DHTs, Wirkstoffe geschmiert und oral appliziert) läßt sich nicht schlüssig erklären, zumal zur Auslösung des DHT für

Hirudin	100 µg/0,1 ml, d.s.	12,5 nMol
Eglin b	80 µg/0,1 ml, d.s.	10 nMol
Bdellin B	200 µg/0,1 ml, d.s.	10 nMol

intracutan gespritzt worden waren. Danach würde man eher für Hirudin einen größeren Plaquedurchmesser erwarten. Andererseits induzierten die beiden anderen Blutegelinhibitoren bei eventuell stärkerer Antigenität einen höheren Antikörperspiegel. Es ist jedoch auch möglich, daß der in der Salbenzubereitung sich befindliche Blutegelrohextrakt anteilsmäßig mehr Egline und Bdelline als Hirudin enthielt. Dieses Mengenverhältnis wurde noch nicht eindeutig geklärt, zumal bislang widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden (DIETL und SEEMÜLLER: persönliche Mitteilung). Dies ist eventuell auch darauf zurückzuführen, daß das Mengenverhältnis der Inhibitoren im Rohextrakt von Charge zu Charge unterschiedlich ist.

Immunisierung durch orale Applikation

Ziel der Fütterungsversuche war es festzustellen, ob die orale Aufnahme der Salbenwirkstoffe ebenfalls eine Antikörperproduktion induziert. Dies erschien uns deshalb wichtig, da sich die geschmierten Meerschweinchen ebenso wie die unbehandelten Tiere selbst ausführlich putzten (leckten). Man muß davon ausgehen, daß sie dabei auch Salbenreste oral aufnahmen, die nicht vollständig in die Haut eingedrungen waren. Um festzustellen, ob der Wirkstoffträger (die Salbengrundlage) eine entscheidende Rolle spielt, wurden einmal die Wirkstoffe in Salbenform und zum Vergleich in wässriger Lösung verfüttert.

Von den 10 Meerschweinchen dieses Versuchsabschnitts zeigten 8 Tiere eine Antikörperbildung für Hirudin, 9 für Eglin b und 8 für Bdellin B. Dabei war das Ausmaß der Plaquegröße bzw. der Antikörperproduktion wesentlich von der oral aufgenommenen ATE-Menge abhängig (s. Tabelle 24). Die Gesamtdosis von 200 - 300 ATE/Tier ergab für Hirudin meist eben noch positive Plaquedurchmesser von 5 mm. Erst die 60fache Dosis von 12 000 ATE/Tier ergab eine Nachweisempfindlichkeit für Hirudin von 20 µg/0,1 ml.

Normalerweise ist, z.B. beim erwachsenen Menschen eine Antikörperbildung über den oralen Weg relativ schwierig zu erreichen (de WECK 1981). Gerade Proteine und Polypeptide werden durch die Magensäure rasch denaturiert, wobei meist auch die antigene Determinante betroffen ist.

Alle 3 applizierten Inhibitoren weisen jedoch eine relativ hohe Säurestabilität auf (JAKOBJ 1904; MARKWARDT 1956; SEEMÜLLER 1979). Andererseits wird Hirudin jedoch durch Pepsin zu 80 % und durch Trypsin zu 100 % zerstört (MARKWARDT 1963). Auch Eglin wird im pH-Optimum des Trypsins durch dieses Enzyms proteolytisch abgebaut (SEEMÜLLER 1979). Das bedeutet aber, daß die genannten Inhibitoren durch proteolytische Fermente des Magen-Darm-Traktes rasch abgebaut und somit auch deren antigene Determinanten zerstört werden.

Man könnte sich nun vorstellen, daß die Resorption der Wirkstoffe bei den Meerschweinchen teilweise bereits in der Mundschleimhaut stattfindet. Das ist insofern denkbar, als die oral gefütterten Meerschweinchen das Maul voller Salbe hatten und diese mindestens einige Minuten und Reste davon vermutlich auch noch länger darin verblieben.

Von der wirklichkeitsnahen Annahme ausgehend, daß die Tiere beim Putzen immer nur geringste Mengen Salbe bzw. Wirkstoffe oral aufnahmen und diese vermutlich rasch schluckten, dürfte die Kontakt-

zeit mit der Mundschleimhaut bei den geschmierten Tieren nur sehr kurz gewesen sein, entsprechend gering demnach die Stimulierung der Antikörperproduktion.
Vergleicht man die absolut über die Haut (Tabelle 5) und oral (Tabelle 24) verabreichten ATE-Mengen, so liegt die Folgerung nahe, daß bei insgesamt 1 000-2 000 ATE (über Wochen einem Tier cutan verabfolgt) wohl nicht mehr als 200-300 ATE oral aufgenommen werden konnten, bei ca. 50 000 ATE (cutan appliziert) nicht mehr als 12 000 ATE.
Dies bedeutet für die Beurteilung der Ergebnisse der Tiere der Schmiergruppen, daß man eine eventuelle orale Stimulierung der Antikörperproduktion vernachlässigen kann. In Relation zu den geschmierten ATE-Mengen gesehen, würde nämlich bei der oralen Gruppe eine zu hohe Wirkstoffmenge appliziert, um eine mögliche Stimulierung der Antikörperproduktion auf diesem Wege überhaupt aufzeigen zu können.
Andererseits sollte man einen Minimalspiegel an Antikörpern, der durch orale Salbenaufnahme (beim Putzen) zustande kam, nicht grundsätzlich ausschließen. In diesem Falle könnte man für Hirudin, bei positiven Ergebnissen mit der unverdünnten Lösung, erst Plaques, deren Durchmesser größer als 6 mm sind (s. Tabelle 23), auf die Resorption durch die Haut zurückführen, entsprechend dann für Eglin b und Bdellin B Plaques mit Durchmessern, die größer als 9 mm sind (s. Tabelle 50).

Die Verfütterung der Wirkstoffe in Salbenform bzw. als Lösung erbrachte keine unterschiedlichen Ergebnisse.

Tabelle 50 Vergleich der positiven Plaquedurchmesser beim DHT für Eglin b und Bdellin B, jeweils mit unverdünnter Lösung ausgelöst, bei geschmierten und gefütterten Meerschweinchen

Die angegebenen Plaquedurchmesser stellen Mittelwerte dar, die aus der angegebenen Zahl von Tests (= Tierzahl) errechnet wurden.

Wirkstoff-applikation	Tier-zahl	Plaquedurchmesser (mm) Eglin b	Bdellin B
oral	9[a], 8[b]	9	9
Schmierung	je 7	16	15

[a] für Eglin b; [b] für Bdellin B

Intraperitoneale Immunisierung

Ziel der intraperitonealen Immunisierung von Meerschweinchen war die Induktion speziell von IgE-Antikörpern gegen die Blutegelwirkstoffe.

Dabei galt es, die Reaktion der Suppressor-Zellen der T-Lymphozyten zu unterdrücken, die erstens die IgE-Sekundärantwort verhindern und zweitens die IgG-Produktion zu Ungunsten der IgE-Synthese stimulieren (SCHNITZLER 1979; BENDIXEN 1981; de WECK 1981).

Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) bewirkt eine Unterdrückung der T-Suppressorzellen und trägt somit indirekt zu einer vermehrten IgE-Bildung bei (POLAK und TURK 1974; SEHON und LIE 1980; deWECK 1981; TURK 1980). SCHEUBER und BECK (1980) konnten zeigen, daß ein Zustand der Kaumansprechbarkeit gegenüber sensibilisierenden Agentien beim Meerschweinchen durch Gabe von Cyclophosphamid 48 Stunden vor der Sensibilisierung durchbrochen und die

IgE-Antikörperproduktion im Serum um den Faktor 60 gegenüber unvorbehandelten Tieren gesteigert werden kann.

LEVINE et al. (1971) und OVARY et al. (1976) konnten andererseits nachweisen, daß beim Meerschweinchen die wiederholte Applikation geringster Antigenmengen, adsorbiert an Alugel, die IgE-Synthese zu Ungunsten der IgG-Synthese stimulieren.

Beide Substanzen, Cyclophosphamid und Alu Gel, wurden bei unseren Immunisierungsversuchen eingesetzt.

Die intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen wurden im DHT getestet, ihre Seren im PCA-Test.

Von 6 im DHT untersuchten Tieren waren 5 für alle getesteten Inhibitoren positiv, eines reagierte gegenüber den 3 Miniproteinen ohne nachweisbare Antikörperbildung (s. Tabelle 25).

Die DHTs und Blutabnahmen für die PCA-Reaktionen wurden jeweils 10 Tage nach der letzten Boosterung ausgeführt, da man zumindest bei Ratten am 9. Tag nach der letzten Restimulierung die höchsten IgE-Antikörpertiter fand (OPRÉE 1979).

Eine Differenzierung, ob die positiv reagierenden Meerschweinchen IgE-Antikörper, reagine IgG1-Antikörper oder beide Antikörpertypen gebildet haben, läßt sich aufgrund dieses Tests nicht vornehmen.
Auffallend ist die Diskrepanz in der Nachweisempfindlichkeit für Hirudin (2 pg/0,1 ml) gegenüber derjenigen für Eglin b (640 ng/0,1 ml) sowie derjenigen für Bdellin B (1,6 µg/0,1 ml). Aufgrund der kleinen Tierzahl läßt sich jedoch noch nicht endgültig sagen, ob die antigene Potenz des Hirudins größer ist als die der beiden anderen Inhibitoren.

Effektivität der Immunisierungsprozedur

Vergleicht man nun die Mittelwerte der Plaquedurchmesser (für die unverdünnte Lösung) aller im DHT positiven Tiere, aufge-

gliedert nach der Art der Zuführung des Antigens sowie den getesteten Wirkstoffen (s. Tabelle 51), so läßt sich folgende Feststellung treffen:
Auf der Basis der Tatsache, daß der DHT die gebildete Antikörpermenge halbquantitativ wiedergibt, findet man für die Reihenfolge der Antigenzufuhr: intraperitoneal → geschmiert → oral abnehmende Plaquedurchmesser bzw. Antikörperkonzentrationen für alle drei Inhibitoren. Das bedeutet, daß mit Hilfe der intraperitonealen Immunisierung die höchsten Antikörperspiegel erreicht wurden.

Nachweis resorbierter Wirkstoffe im Serum

Zum Nachweis von freien Blutegelwirkstoffen im Serum mittels des DHTs wurden die Tiere der Gruppe H insgesamt nur 2,5 Tage lang geschmiert, da nach dieser Zeit wahrscheinlich noch keine oder zumindest nur eine sehr geringe Antikörperproduktion gegen die Bestandteile des Blutegelrohextraktes stattgefunden hat. Antikörper würden die freien, im Serum befindlichen Blutegelwirkstoffe abfangen und diese könnten dann nicht mehr über den DHT nachgewiesen werden.

Das Prinzip speziell dieses DHTs beruhte darauf, daß an Stelle der üblichen definierten Antigenlösung (Hirudin, Eglin b oder Bdellin B) das S e r u m der geschmierten Tiere (Gruppe H) intracutan gespritzt wurde. Der DHT wurde so zum Nachweis der Resorption von Blutegelwirkstoffen durch die Haut mit Übertritt ins Blut verwendet. Es war vor Auslösung des DHTs nicht bekannt, ob sich freie Blutegelwirkstoffe in den betreffenden Serumproben befanden und ob das für den DHT verwendete, intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen (Nr. 362) Antikörper gegen die Blutegelwirkstoffe gebildet hatte. Letzteres wurde dadurch erkannt, daß zuvor der PCA-Titer des Serums dieses Tieres gegen Hirudin bestimmt wurde. Er war mit 1:256 hoch positiv. Die Antikörpertiter dieses Meerschweinchens gegen Eglin b und Bdellin B wurden ebenfalls mittels der PCA-Reaktion bestimmt (s. D.1.6).

Tabelle 51 Mittelwerte der Plaquedurchmesser (ausgelöst mit unverdünnter Lösung) aller im DHT positiv reagierenden Meerschweinchen, aufgegliedert nach Art der Zuführung des Antigens sowie nach den getesteten Wirkstoffen

DHT gegen	Plaque mm Ø
Hirudin	
5 Tiere, i.p. immunisiert	18
21 Tiere, geschmiert	13
8 Tiere, oral gefüttert	6
Eglin b	
4 Tiere, i.p. immunisiert	18
7 Tiere, geschmiert	16
9 Tiere, oral gefüttert	9
Bdellin B	
4 Tiere, i.p. immunisiert	14
7 Tiere, geschmiert	15
8 Tiere, oral gefüttert	9

Sie betrugen für Eglin b 1:128 und für Bdellin B 1:64.

Im DHT wurden keine Standardantigenlösungen (Blutegelrohextrakt, reine Inhibitoren) zum Vergleich der Plaquegröße und damit der im Serum absolut enthaltenen Wirkstoffmenge mitgespritzt, da der Blutegelrohextrakt schon im Leerwertversuch positiv war (s. D.1.5.1) und da die Unterscheidung der drei Inhibitoren Hirudin, Eglin b und Bdellin B (die in diesen Serumproben gegebenenfalls nebeneinander vorliegen würden) allein anhand des Plaquedurchmessers als Vergleichsgröße nicht möglich ist.

Das positive Ergebnis des DHT (s. Tabelle 26) zeigte eine Antikörperbildung des intraperitoneal immunisierten Meerschweinchens (Nr. 362) gegen die Blutegelwirkstoffe an. Weiterhin ergab sich aus diesem DHT, daß sämtliche 6 Serumproben der Tiere der Gruppe H (2,5 Tage geschmiert) Bestandteile des Blutegelrohextraktes oder zumindest Bruchstücke der Blutegelwirkstoffe mit intakter antigener Determinante enthielten. Dies bedeutet konsequenterweise, daß diese Wirkstoffe durch die Haut resorbiert worden waren.

Für die zu unterschiedlichen Zeiten nach Schmierung abgenommenen Seren der Meerschweinchen der Gruppe H ergaben sich im DHT verschieden große Plaquedurchmesser. Da der Test halbquantitativ mißt, konnte aus den Plaquedurchmessern auf die Größenordnung des Blutegelgesamtrohextrakts im Serum der geschmierten Tiere geschlossen werden.

Aus Abbildung 7 läßt sich eine Relation zwischen der Konzentration der freien Wirkstoffe im Serum (Gruppe H) in Bezug auf den Zeitpunkt der Schmierung bzw. Blutabnahme herstellen. Danach liegt das Konzentrationsmaximum bei ca. 70 min nach Schmierung.

MARKWARDT (1963) fand nach subcutaner Applikation von Hirudinlösung am Kaninchen den maximalen Serumspiegel ca. 55 min nach Injektion.

Vergleicht man nun trotz der methodischen Unterschiede (subcutane Injektion von Hirudinlösung beim Kaninchen versus percutane

Schmierung einer Blutegelwirkstoffsalbe am Meerschweinchen) die beiden Serumspiegel im zeitlichen Verlauf, so wird erwartungsgemäß bei subcutaner Injektion der höchste Serumspiegel ca. 15 min früher gefunden als bei percutaner Schmierung. Dies wäre insofern verständlich, als die Barriere zu den Blutkapillaren über die Hornschicht größer ist, deshalb auch eine längere Zeitspanne für die Penetration benötigt wird. Den limitierenden Faktor für die Resorption stellt die Hornschicht dar; man spricht deshalb von einer Barrierefunktion der Hornschicht (ZESCH 1981).

Weitere Argumente zur Resorption der Blutegelwirkstoffe

Bei der Interpretation der cutanen Resorption der Blutegelwirkstoffe über ihren Nachweis im Serum sollte man berücksichtigen, daß den Meerschweinchen mit 7 400 ATE/kgKG/Tier/Tag eine relativ hohe Wirkstoffdosis appliziert wurde. Im einzelnen betrug diese z.B. bei den zwei über 2,5 Tage geschmierten Tieren (Durchschnittsgewicht 513 g):

täglich verabreichte Hirudinhemmaktivität: 3 800 ATE/Tier
insgesamt verabreichte Hirudinhemmaktivität: 9 500 ATE/Tier
(Blutabnahmen erfolgten nach der 4. bzw. 7. Schmierung)

Bei dieser sozusagen "konstant" applizierten Dosis scheint uns die direkte Nachweisbarkeit der Wirkstoffe im Serum nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts mittels der extrem empfindlichen immunologischen Methoden durchaus gegeben. Dazu kommt, daß die Tiere an über 50 % ihrer Köperoberfläche geschmiert wurden, die Absorptionsfläche demnach sehr groß war. Die Zeitpunkte der Blutabnahmen (2. bzw. 3. Tag der Schmierung) waren außerdem so gewählt, daß die notwendige Zeitspanne gegeben war, die im Stratum Corneum zum Aufbau eines Reservoirs für die Salbe sowie hinsichtlich der Blutegelwirkstoffe zur Ausbildung eines Diffusionsgleichgewichts (im steady state) durch alle Schichten der Hornhaut benötigt wird (ZESCH 1981).

BARTEK et al. (1972) fanden beim einmaligen Auftragen von verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen auf die Haut (bei Mensch, Minischwein, Kaninchen und Ratte) bei Registrierung der Radioaktivität im Urin über 5 Tage (alle 24 Std gemessen) bei allen Spezies durchwegs die höchsten Strahlungsintensitäten nach 24 Stunden.

Die Haut ist in vitro in der Reihenfolge: Mensch, Schwein, Meerschweinchen, Ratte und Kaninchen zunehmend permeabler, und zwar nicht nur für ionische und kovalente niedermolekulare Substanzen in wässriger Lösung, sondern auch für organische Lösungen (TREGEAR 1966a). Bei in vivo Versuchen erhielten BARTEK et al. (1972) ähnliche Ergebnisse.

Die bessere Permeabilität der Meerschweinchenhaut ist unter Umständen auch darauf zurückzuführen, daß sie dünner ist als die menschliche Haut (CHRISTOPHERS 1981; ORFANOS 1981). Trotz höherer Permeabilität der Meerschweinchenhaut ist eine Penetration der Blutegelwirkstoffe auch beim Menschen denkbar, insbesondere wenn diese entzündlich verändert ist und damit permeabler wird.

Meistens wird für Resorptionsuntersuchungen beim Menschen der Unterarm und bei Tieren der Rücken gewählt. FELDMANN und MAIBACH (1967) fanden aber beim Menschen für die Rückenhaut eine 1,7mal höhere Resorptionsrate als für die Haut des Unterarms. Dies bedeutet, daß man für die menschliche Haut eine mit der tierischen Haut eventuell vergleichbare Resorptionsrate erhalten könnte, wenn man die Substanzen ebenfalls auf die Rückenhaut applizieren würde.

Über die Bedeutung des Resorptionsweges durch die Hautanhangsgebilde, die Talg-, Schweißdrüsen und Haarfollikel, liegen in der Literatur recht entgegengesetzte Aussagen vor:
Während beim erwachsenen Menschen die percutane Resorption über Hautanhangsgebilde laut SCHAEFER (1981) aufgrund eines Anteils von nur 0,1 % der Gesamtoberfläche keine überragende Rolle spielt, fanden KOOTEN und MALI (1966), daß die Penetration über-

wiegend über diesen Weg stattfindet. Ein solcher Penetrationsweg kann somit für eine stark behaarte Haut, wie sie das Meerschweinchen zweifellos besitzt, sehr bedeutend sein (SCHEUPLEIN 1978a).

Ein weiterer Punkt, der dafür spricht, daß sich in den Seren der geschmierten Meerschweinchen Blutegelwirkstoffe befanden, war die Beobachtung, daß die Blutprobe eines Tieres 24 Stunden nach Entnahme noch nicht geronnen war (s. D.3.1). Eine hochgradige Koagulopathie war bei diesem Tier nicht erkennbar. Wahrscheinlicher ist, daß resorbiertes Hirudin als spezifischer Thrombininhibitor die Blutgerinnung verhinderte. Nach MARKWARDT (1956) "steigt die Gerinnungszeit des Blutes mit waschsender Hirudinkonzentration rasch an und von einer bestimmten Konzentration ab ist die Gerinnung des Blutes total gehemmt, so daß auch nach Tagen keine Gerinnung zu beobachten ist." Eventuell erfolgte die Blutabnahme bei diesem Meerschweinchen im Maximumbereich der Hirudinkonzentration.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß alle getesteten Meerschweinchen, die im DHT positiv reagierten, gegen die jeweils injizierte Substanz Antikörper gebildet haben müssen.

Empfindlichkeit des DHT

Die Empfindlichkeit des DHT mit einer unteren Nachweisgrenze im Picogrammbereich (s. intraperitoneal immunisierte Meerschweinchen 2 pg Hirudin/0,1 ml = 20 pg/ml) ist damit wesentlich größer als z.B. diejenige des Radioimmunoassays mit einer Nachweisgrenze im Nanogrammbereich.

E.1.4 Passive Cutane Anaphylaxie

Antikörper in Seren geschmierter Meerschweinchen (s. Tabellen 27a und 27b)

Bei den mit Seren geschmierter Meerschweinchen durchgeführten PCA-Tests (ausgelöst mit Hirudin, Eglin b und/oder Bdellin B) waren alle 10 Seren der Tiere ohne Salben- und mit Salbengrundlagenbehandlung n e g a t i v, unabhängig davon, ob die Tiere einzeln gehalten wurden oder in Sammelkäfigen mit Blutegelwirkstoff behandelten Tieren zusammen lebten oder im DHT eine positive Reaktion zeigten.

Bei 6 PCA-Tests mit 4 Seren von mit der 500 ATE/100 g-Salbe geschmierten Tieren war nur eines positiv während demgegenüber alle 4 Seren der mit der 20 000 ATE/40 g-Salbe behandelten Tiere gegenüber Hirudin positiv reagierten.

Es ist deshalb wahrscheinlich, daß mit steigender Menge an appliziertem Wirkstoff außer der Anzahl der von spezifischen Antikörpern besetzten Rezeptoren an Mastzellen (positive DHTs), auch der Blutspiegel der spezifischen Antikörper anstieg, der für die PCA-Reaktion auslösend ist. Oder anders ausgedrückt: Je höher die Antigenzufuhr, desto eher treten spezifische Antikörper im Blut auf.

Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse beim DHT und der PCA böte sich an, daß bei geringerem Sensibilisierungsgrad die IgE-Antikörper vorwiegend zellständig vorliegen und somit die Antikörperkonzentration im Blut zu gering ist, um über die PCA-Reaktion gemessen werden zu können.

Erwartungsgemäß wären die zusammen lebenden Tiere ohne Salben- und mit Salbengrundlagenbehandlung in einem zu geringen Maße sensibilisiert worden, um eine positive PCA-Reaktion auslösen zu können.

Der positive PCA-Titer von 4 des Serumpools (s. D.1.6.1) besagt, daß sich die PCA-Reaktion reproduzieren ließ und daß auch noch in Serumverdünnungen Antikörper nachweisbar waren. Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, daß Hirudin resorbiert wurde und dann eine humorale Antikörperproduktion ausgelöst hat.

Zur Frage des gebildeten Antikörpertyps

Eine Unterscheidung, ob vorwiegend oder ausschließlich IgE-Antikörper für die PCA-Reaktionen verantwortlich waren, läßt sich nur in einem Fall (Serum Nr. 100) treffen, da alle übrigen Seren nur nach 72 std. Reaktionszeit getestet wurden, Serum Nr. 100 dagegen in erhitzter und nicht erhitzter Form zusätzlich auch nach 4 std. Reaktionszeit.

OVARY et al. (1976) definieren reagine Antikörper als der IgE-Klasse zugehörend, wenn folgende 2 Bedingungen erfüllt sind:
- Die PCA-Reaktivität persistiert in der Haut über mindestens 7 Tage, d.h. die PCA-Reaktion kann bis zu 7 Tagen nach intracutaner Injektion des Serums ausgelöst werden.
- Die PCA-Reaktivität wird beim Erhitzen des Serums auf 56°C für 1 Stunde zerstört, da die hitzelabilen IgE-Antikörper durch Erwärmen denaturiert werden.

Zum Nachweis der IgE-Antikörper ist eine 72 std. Reaktionszeit ausreichend, da danach die gleichen Ergebnisse erhalten werden wie nach 7 Tagen (SCHEUBER et al.: in Vorbereitung). MOTA (1981) und OPRÉE (1979) geben als optimale Sensibilisierungszeit für IgE-Antikörper ebenfalls 72 Stunden an, für IgG-Antikörper dagegen 4-6 Stunden.

Die lange Persistenz der Antikörper im Gewebe bis zu mehreren Wochen ist spezifisch für die IgE-Klasse. Sie erklärt sich durch die extrem langsame Abdissoziationsrate der Antikörper von den Mastzellrezeptoren (KULCZYCKI 1981).

Reagine gewebeständige Antikörper vom Typ IgG, beim Meerschweinchen speziell IgG_1, sind normalerweise nach 48 Stunden, maximal jedoch nach 4 Tagen nicht mehr im Gewebe nachweisbar (OVARY et al. 1976; MOTA 1981; SCHEUBER et al.: in Vorbereitung). Eine positive PCA-Reaktion nach 72 Stunden Reaktionszeit kann somit nur noch zu einem sehr geringen Anteil auf gewebeständige IgG-Antikörper zurückzuführen sein. Letztere werden über die 4 std. Reaktionszeit erfaßt (LEVINE et al. 1971; OPRÉE 1979).

Für das Serum des Meerschweinchens Nr. 100 wurde die PCA-Reaktion zweimal ausgelöst: das erste Mal nach 4 std. Reaktionszeit mit Proben des nativen und erhitzten Serums sowie nach 72 std. Reaktionszeit mit nativem Serum, das zweite Mal nur für die 72 std. Reaktionszeit nach 5monatiger Lagerung des Nativserums. Das Ergebnis gibt Tabelle 27a wieder:

Auszug aus Tabelle 27a:

Reaktionszeit in Std.	Serumprobe	Plaquedurchmesser in mm 1. Mal	2. Mal
72	nativ	15	0
4	nativ	8	
4	erhitzt	10	

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das betreffende Meerschweinchen zwar überwiegend IgE-Antikörper gebildet hatte (s. 72 std. Reaktionszeit), daß aber auch reagine Antikörper der IgG-Klasse gebildet worden sind (s. 4 std. Reaktionszeit mit nativem und erhitztem Serum). Diese Interpretation gilt allerdings nur mit folgender Einschränkung:
Das Serum wurde 30 min auf 56°C erhitzt. Es ist durchaus möglich, daß diese Zeitspanne zur vollständigen Zerstörung der IgE-Antikörper nicht ausreichte. In der Literatur sind diesbezüglich nämlich sehr unterschiedliche Empfehlungen zu finden, so z.B.: 30 min (SCHNITZLER 1979; SCHEUBER und BECK 1980), 1 Stunde (OVARY et al. 1976), 2 Stunden (LEVINE et al. 1971; OPRÉE 1979), 4 Stunden (BIER und GÖTZE 1981; RING 1981; GERSHWIN 1981) und mehrere Stunden (KULCZYCKI 1981).

OVARY et al. (1976) diskutierten auch die Möglichkeit der Existenz einer hitzestabilen Untergruppe von IgE-Antikörpern. Um dies zu überprüfen, wurde der PCA-Test ein zweites Mal für die 72 std. Reaktionszeit durchgeführt, diesmal allerdings mit negativem Ergebnis. Der Unterschied bei der Durchführung der 2 PCA-Tests mit dem gleichen Serum bestand darin, daß das Serum zuvor das 1. Mal nur 4 Tage, das 2. Mal jedoch 5 Monate bei -30°C gelagert worden war.

Es ist bekannt, daß IgE-Antikörper bei längerer Lagerung selbst bei -80°C nicht beständig sind (SCHEUBER et al.: in Vorbereitung). Zuvor positive PCA-Tests waren nach Lagerung der Seren über einige Monate bei -80°C ausschließlich negativ. Ähnliche Beobachtungen liegen auch von OVARY et al. (1976) vor: Nach Lagerung bei -70°C für 3 Monate waren 50-75 % der IgE-Aktivität verschwunden.

Da die Seren der Tiere aus der Gruppe O größtenteils 5 Monate bei nur -30°C aufbewahrt worden waren, ist davon auszugehen, daß es während dieser Zeit bei der relativ hohen Temperatur (verglichen mit -70°C) zu einem totalen Aktivitätsverlust der IgE-Antikörper gekommen ist. Der negative Ausgang des zweiten PCA-Tests läßt sich damit zwanglos erklären. Dies bedeutet aber auch, daß beim ersten PCA-Test IgE-Antikörper für die positive Reaktion verantwortlich waren, da IgG-Antikörper eine solche Lagerung ohne Aktivitätsverlust überstehen (SCHEUBER et al.: in Vorbereitung).

Ob es bei der Lagerung der Seren der Gruppen A und B (2 Monate bei -80°C) ebenfalls zum Aktivitätsverlsut der IgE-Antikörper kam und dieser für den negativen Ausgang der PCA-Reaktion mit diesem Serum verantwortlich ist, bleibt dahingestellt.

Ursachen einer Nichtstimulierbarkeit

Das Ergebnis des Tieres Nr. 282 (aus Gruppe A, zusammen lebend, geschmiert mit 20 000 ATE/40 g) - DHT negativ, PCA positiv - läßt sich wie folgt deuten:
Dieses Meerschweinchen war von Anfang an auffällig. Es zeigte ganz im Gegensatz zu den anderen Tieren der konzentrierten Salbengruppe kaum eine Hautreaktion auf die Schmierung: die Rötung war minimal (Erstauftreten am 12. Tag), Papeln traten niemals auf. Gegen Ende der Schmierperiode war auch die Rötung nicht mehr feststellbar, jedoch verfärbte sich die Haut deutlich gelbbraun. Die Obduktion ergab dann, daß das Tier eindeutig krank war (s. D.2.1).

Beim Menschen wurde die Beobachtung gemacht, daß bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden Hauttests schwach oder negativ ausfallen und daß diese Anergie nach Reduktion der Tumormasse reversibel ist (BRATTIG et al. 1981).
Es ist denkbar, daß das kranke Meerschweinchen zwar reagine Antikörper gebildet hatte, diese jedoch aufgrund seiner Krankheit nicht zellständig fixiert wurden. Dann mußte das Tier im DHT zwangsläufig negativ reagieren,während die freien Serumantikörper mittels der PCA-Reaktion nachgewiesen werden konnten.

Antikörper in Seren i. p. immunisierter Tiere

Die Seren der intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen aus Gruppe 1 wurden im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt und kamen 3-5 Tage nach Blutabnahme zur Austestung.

Von den 7 Seren waren alle positiv für Hirudin und jeweils 6 für Eglin b und Bdellin B.

Die Meerschweinchen wiesen für alle 3 Blutegelwirkstoffe PCA-Titer bis 1:256 auf. Dabei scheint die Titerhöhe vom Geschlecht

und vom Alter der Tiere abhängig zu sein: Junge und/oder weibliche Tiere wiesen für alle 3 Inhibitoren Titer von 1:64 bis 1:256 auf, alte und/oder männliche Tiere nur solche von 1:1 bis 1:32.
Es ist bekannt, daß weibliche Meerschweinchen besser auf Immunisierungen ansprechen (SCHEUBER et al.: in Vorbereitung). Die Feststellung von BIER und GÖTZE (1981), daß junge Tiere generell schlecht auf Immunisierungen reagieren, hat sich allerdings bei unseren Untersuchungen nicht bestätigt, eventuell ist die Sensibilität auch von der Art des zugeführten Antigens abhängig.

Die Meerschweinchen wurden vor der Immunisierung ausnahmslos mit Cyclophosphamid vorbehandelt (s. C.1.3). Die bei jungen und weiblichen Tieren nach 3,5 Monaten erreichte Titerhöhe der Antikörper ist nur geringfügig niedriger als diejenige, die SCHEUBER und BECK (1980) bei Cyclophosphamidvorbehandlung und nachfolgender Immunisierung mit Botulinus Toxin C erhielten.

Die Blutegelwirkstoffe erwiesen sich damit, obwohl von relativ kleiner Molekülmasse (5 000 - 8 000 Dalton), nach Adsorption an Alu Gel bei intraperitonealer Injektion in Meerschweinchen als immunogen. Offensichtlich übte Hirudin dabei die stärkste immunogene Wirkung aus, da die Tiere für diesen Blutegelinhibitor anteilsmäßig am häufigsten höhere bis hohe Titer aufwiesen (s. Tabelle 33).

Unterschiedliche Reaktion bei DHT und PCA

Beim Vergleich der Ergebnisse der an bzw. von demselben Meerschweinchen durchgeführten DHTs bzw. PCA-Reaktionen fällt auf, daß bei 2 Tieren (Nr. 284, 285) diese Reaktionen nicht gleichsinnig ausfielen (s. Tabelle 37).

Bei Tier Nr. 284 könnte die negative PCA-Reaktion für Eglin b und Bdellin B, bei positiver PCA-Reaktion für Hirudin und positivem DHT für alle 3 Blutegelwirkstoffe, mit für eine positive Plaquebildung nicht ausreichenden Serumspiegeln der betreffenden spezifischen Antikörper erklärt werden.
Bei Tier Nr. 285 (alle PCA-Reaktionen positiv, alle DHTs negativ) dürften die reaginen Antikörper von den Mastzellen des immunisierten Meerschweinchens nicht gebunden worden sein.

Zusammenfassende Wertung

Die positiven PCA-Tests belegen die Bildung von Antikörpern gegen das jeweils zur Auslösung verwendete Antigen. Bei den geschmierten Meerschweinchen sprechen sie auch für eine Resorption des Hirudins durch die intakte Haut. Die intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen bildeten durchwegs hohe Antikörpertiter gegen alle 3 Inhibitoren der Blutegel, obwohl diese aufgrund ihrer relativ kleinen Molekülmasse (5 000 - 8 000 Dalton) nach BIER und GÖTZE (1981) nur sehr schwach immunogen wirksam sein dürften. Andererseits ist jedoch bekannt, daß für die Erkennung von Antigenen auch genetische Faktoren von entscheidender Bedeutung sein können (BIER und GÖTZE 1981). In dieser Hinsicht kommt den Meerschweinchen eine Sonderstellung zu, da sie für viele Immunogene sehr sensibel sind und sich deshalb für Immunisierungsversuche der geschilderten Art besonders eignen. Dabei ist auch zu berücksichtigen, daß die Blutegelwirkstoffantigene vor der Injektion zur Unterstützung der Antikörperproduktion an Alu Gel als Adjuvans adsorbiert worden waren. Aufgrund der verwendeten Immunisierungsschemata und der Eigenschaften der erhaltenen Inhibitor-spezifischen Antikörper (Hitzestabilität etc.) läßt sich folgern, daß diese zumindest teilweise dem IgE-Typus zuzuordnen sind.

E.2 Zu den pathologisch-morphologischen Untersuchungen

Die über eine Woche mit Salbe gefütterten Meerschweinchen der Gruppe "orale Kontrolle" wiesen an den Organen des Magen-Darm-Traktes auch histologisch keine nachweisbaren Veränderungen auf. Die Salbe mit 20 000 ATE/40 g oral gegeben, hat die Meerschweinchen damit zumindest für den Zeitraum von 1 Woche nicht sichtbar beeinträchtigt.

Die Veränderungen der Bauch- und Rückenhaut (Verbreiterung der Epidermis, Hyperkeratose, verlängerte Reteleisten, s. D.2.2) der geschmierten Meerschweinchen zeigten eine gewisse Abhängigkeit von der Schmierdauer und der Art der verwendeten Salbe. Je länger geschmiert und je mehr ATE appliziert worden waren, desto ausgeprägter waren die Veränderungen. Zur Frage der Toxizität der Salbenwirkstoffe s. Abschnitt E.1.1.

Die histologisch faßbaren Veränderungen der lokalen anaphylaktischen Reaktionen (Plaques - DHT, s. D.2.2) waren von der Art des zur Auslösung verwendeten Antigens abhängig sowie von der Zeitdauer der Sensibilisierung (72 Std., 4 Std., 15 min). Je reiner das Antigen war, desto diskretere Veränderungen fanden sich histologisch. Welches das eigentlich auslösende Agens der ausgeprägten Muskelnekrosen bei Injektion von nicht dialysiertem und dialysiertem vorgereinigtem Blutegelrohextrakt war, bleibt offen.

Ausgehend von der Überlegung, daß mit der Stimulierung der IgE-Antikörperproduktion eventuell vermehrt Mastzellen (Träger der IgE-Antikörper) und auch Plasmazellen (Produktion der IgE-Antikörper) in der Haut der geschmierten Meerschweinchen als histologisches Korrelat zu finden wären, wurden die genannten Zellen nach dem angegebenen Schema (s. D.2.2) ausgezählt und mit der Haut von Kontrolltieren verglichen. Danach ist die Annahme berechtigt, daß die Anzahl der Mastzellen zumindest geringfügig im Laufe der Schmierungen zunimmt. Die Untersuchungen hinsichtlich der Zahl der Plasmazellen sind derzeit noch nicht abgeschlossen (STÖLZLE et al.: in Vorbereitung).

E.3 Zu den hämatologischen Untersuchungen

Hirudin verlängert die Rekalzifizierungszeit von Citratplasma in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge bis zur Ungerinnbarkeit (MARKWARDT 1963). An Stelle der heute nicht mehr gebräuchlichen Rekalzifizierungszeit wurden von uns Thromboplastinzeit und Partielle Thromboplastinzeit (PTT) als Parameter zur Testung der Gerinnungshemmung gewählt.
Nach KLÖSS et al. (1978) kommt es durch die antikoagulatorische Wirkung des Hirudin zu einer Verlängerung der Plasma-Thrombinzeit, der Partiellen Thromboplastinzeit und der Thromboplastinzeit (Erniedrigung des Quickwertes).

Ursprünglich hatten wir geplant, die percutane Hirudinresorption beim Kaninchen anhand der Veränderungen der PTT und des Quickwerts nachzuweisen.

Die Bestimmung der Thromboplastinzeit von Kaninchenplasmen ergab bei Zugabe von 2 bzw. 2,5 ATE/0,1 ml Plasma zwar eine Abnahme des Quickwertes, d.h. eine Verlängerung der Gerinnungszeit, jedoch lagen die Werte noch immer im Bereich der Norm. Hirudinmengen bis zu 25 ATE/ml Plasma haben demnach offensichtlich noch keinen signifikanten Einfluß auf den Quickwert von Kaninchenplasmen.

Die Bestimmung der PTT von 7 Kaninchenplasmen an verschiedenen Tagen ergab eine so große intraindividuelle Streubreite, daß die Verwendung dieses Tests zum Nachweis der zu erwartenden geringen Hirudinmengen in den diversen Plasmen der Versuchstiere nicht geeignet erschien.

Es bestätigte sich jedoch, daß mit steigender ATE-Menge die PTT bis zur Ungerinnbarkeit (bei 68 ATE/0,1 ml) des Plasmas verlängert wird (s. D.3.3).

E.4 Zu den Urinuntersuchungen

Es war weiterhin geplant, die percutane Resorption von Hirudin über dessen Hemmaktivität gegenüber Thrombin in den Urinen der Versuchstiere mittels geeigneter Testsysteme nachzuweisen.

Fibrinogen-Clotting-Test und Hirudintitration

Dabei ergab sich im Fibrinogen-Clotting-Test bereits eine Thrombinhemmung durch die Leerwerturine aller getesteten Spezies (Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten, Mensch) mit erheblichen intraindividuellen Schwankungen von Tag zu Tag unter sonst gleichen Testbedingungen. Diese natürliche Hemmaktivität der Urine war nach 8 Tagen noch voll erhalten (s. D.4.2).
Da beim einzelnen Tier ein konstanter Hemmwert über mehrere Tage nicht vorlag, war der Test zur Überprüfung der Ausscheidung von resorbiertem Hirudin in den Urin nicht einsetzbar.
Diese Beobachtung war insofern nicht überraschend, als bereits JACOBJ (1904) eine gerinnungshemmende Wirkung des Kaninchenharns beschrieben hatte. Interessanterweise besitzt Hundeharn keine gerinnungshemmende Aktivität.

MARKWARDT (1963) benutzte die sogenannte Hirudintitration (Testung der antienzymatischen Aktivität mittels eines synthetischen Estersubstrates für Thrombin), um die Ausscheidung von intravenös und subcutan injiziertem Hirudin im Kaninchenurin nachzuweisen. Er erwähnte dabei nicht, daß diese Urine per se Thrombin hemmen. Aus seiner Versuchsbeschreibung geht auch nicht hervor, ob er diese Leerwerthemmung bei der Berechnung der Hirudinausscheidung berücksichtigt hat. Wenn das nicht geschah, was sehr wahrscheinlich ist, sind die von ihm angegebenen Hirudinausscheidungswerte zu hoch angesetzt.

Chromozym TH-Test

Die Bestimmung der Stabilität des Thrombins in Lösung ("Leerwertstabilität") mittels des Chromozym TH-Test I ergab einen raschen und kontinuierlichen Aktivitätsabfall. Thrombinlösungen konnten deshalb nur zeitlich begrenzt verwendet werden. Nach Zusatz von 0,05 % Triton X-100 zu allen Lösungen (Chromozym TH-Test II) wurde dieser Aktivitätsabfall nicht mehr beobachtet. Die Ausgangsaktivität der Thrombinlösung blieb in Gegenwart des Detergens über Stunden konstant und war mit einem Mittelwert von 64 ΔE/min wesentlich höher als die durchschnittliche Ausgangsaktivität einer mit derselben Thrombinmenge angesetzten Lösung, die kein Detergens enthielt (im Durchschnitt 41,4 ΔE/min).

Als nicht-ionisches Detergens verhindert bzw. mindert Triton X-100 die Adsorption von Enzymen, insbesondere von Thrombin an Plastik, Glas und ähnlichen Oberflächen. Dieser Effekt ist um so größer, je reiner das Protein vorliegt, da dann primär wandhaftende Begleitproteine fehlen und somit vermehrt gereinigtes Protein adsorbiert wird. Bei reinen Enzymen und Wirkstoffen wirkt sich diese Oberflächenhaftung dahingehend aus, daß die Aktivität mit zunehmender Verdünnung der Ausgangslösung überproportional abfällt. Infolge der durch Triton X-100 verhinderten Wandadsorption liegt die Ausgangsaktivität des Thrombins entsprechend über der der detergentienfreien Lösung. Nicht ganz auszuschließen ist, daß Triton X-100 auch eine geringe Aktivierung des Thrombins bewirkt, wie es für andere Enzyme beschrieben wurde (GEIGER et al. 1980; KOZARICH und STROMINGER 1978).

Kaninchen- und Rattenurine beeinflußten den Thrombinleerwert im Chromozym TH-I-Testsystem bis zu einer Menge von 30 µl praktisch nicht. Steigende Blutegelrohextraktmengen im Urin bewirkten eine zunehmende Thrombinhemmung, die auch noch nach 80 Stunden voll erhalten war. Somit könnte bei Resorptionsstudien an Kaninchen und Ratten der Chromozym TH-Test I zum Nachweis der

Hirudinausscheidung in den Urin verwendet werden, sofern eine Empfindlichkeit im gegebenen Falle ausreichend ist. Dabei sollte wegen einer geringen Urin-bedingten Thrombinaktivierung sicherheitshalber erst Hemmung von mehr als 10 % der Thrombinausgangsaktivität dem Hirudin zugeschrieben werden. Für den Resorptionsnachweis von Hirudin an Meerschweinchen kann dieses Testsystem allerdings nicht eingesetzt werden. Die Urine der Tiere aller 3 Meerschweinchenstämme aktivierten oder hemmten den Thrombinleerwert von Tag zu Tag in unterschiedlicher und uncharakteristischer Weise und sogar unabhängig davon, ob den Urinen Hirudin zugesetzt worden war oder nicht.

Nach dem Erhitzen der Blutegelextrakt enthaltenden Urine (10 min bei 80°C) fand sich keine Thrombinhemmaktivität mehr. Nach MARKWARDT (1956, 1963) ist Hirudin jedoch in wässriger Lösung (pH 7,0) bei 15minütigem Erhitzen bis zu 80°C nahezu stabil, vgl. dazu auch JACOBJ (1904). Die Hitzebeständigkeit des Hirudins wird mit steigendem pH-Wert geringer, während eine pH-Verminderung eine Stabilisierung zur Folge hat. Es ist deshalb möglich, daß infolge des hohen pH-Werts von 10 der verwendeten Kaninchenurine eine Inaktivierung des Hirudins beim Erhitzen erfolgte. Der pH-Wert der Rattenurine war nicht bestimmt worden.

E.5 Zu den Aktivitätsbestimmungen von Hirudinlösungen

Die mit dem Fibrinogen-Clotting-Test vorgenommenen wöchentlichen Aktivitätsbestimmungen von verschiedenen Proben dialysierter, vorgereinigter Blutegelrohextraktlösungen ergaben einen sehr unregelmäßig schwankenden zeitlichen Verlauf der Aktivität, zeigten über einen längeren Zeitraum (Wochen) hinweg jedoch eindeutig die Tendenz einer Aktivitätsabnahme. Dabei waren die Proben zwischen den einzelnen Bestimmungen bei -30°C tiefgefroren.
Im Gegensatz dazu gibt MARKWARDT (1963) an, daß wässrige Hirudinlösungen ihre Aktivität bei Zusatz eines Antiseptikums und

Aufbewahrung bei Zimmertemperatur über 6 Monate unverändert bewahren.

Es kann nun sein, daß eine vermutlich von Messung zu Messung unterschiedlich starke Oberflächenadsorption (s. E.4) von Hirudin und Thrombin für die starke Streuung der Aktivitätswerte verantwortlich war. Allerdings wurden vorgereinigte Blutegelrohextraktlösungen zu den Tests eingesetzt, d.h. es waren eigentlich noch genügend Begleitproteine zum Schutz des Hirudins vor Adsorption vorhanden. Trotz Anwesenheit von Begleitproteinen hatte die Zugabe von 0,05 % Triton X-100 zu Blutegelrohextrakt- bzw. Hirudinlösungen jeweils höhere Hemmwerte ergeben, wobei dieser Effekt bei Reinhirudinlösungen am stärksten ausgeprägt war. Daraus läßt sich folgern, daß auch Hirudin an Oberflächen adsorbiert wird, und zwar auch in Gegenwart von Begleitproteinen, sofern es in verdünnteren Lösungen vorliegt. Da MARKWADT (1963) für seine Testansätze wesentlich höher konzentrierte Hirudinlösungen verwendete wie wir - sein Testsystem war weniger empfindlich - war unter Umständen der Adsorptionseffekt in seinen Tests noch nicht nachweisbar.

Die Tatsache einer steten Abnahme der Hemmaktivität der vorgereinigten, dialysierten Blutegelrohextraktlösungen ist auch bei Berücksichtigung dieser methodischen Schwierigkeiten zweifelsfrei gegeben.

Bei der Dialyse von vorgereinigter Blutegelrohextraktlösung sowie von Urinen mit zugesetzten Blutegelwirkstoffen ergab sich ein durchschnittlicher Verlust der Hemmaktivität von 25 %. Auch JACOBJ (1904) beobachtete bei längerer Dialyse, daß Hirudin "die Membran" (nicht näher bezeichnet) passierte und sich in kleinen Mengen im Dialysat nachweisen ließ.

Die Bestimmung der Hemmaktivität von Reinhirudinlösungen im Chromozym TH-Test II ergab aufgrund des Zusatzes von 0,05 % Triton X-100, wie schon erwähnt (s. E.4), gleichmäßig reproduzierbare und höhere Hemmaktivitätswerte für Hirudin als in Abwesenheit des Detergens.

E.6 Zum Nachweis von gegen Hirudin gerichtete Meerschweinchenantikörper und deren Titerbestimmung mit dem Chromozym TH-Test II

Prinzip des Tests

Mit dem Chromozym TH-Test II sollten gegen Hirudin gerichtete Antikörper im Serum intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen nachgewiesen werden.
Das Prinzip des Tests besteht in der Inkubation ("Vorinkubation") einer die spezifischen Antikörper enthaltenden Serumverdünnungsreihe mit jeweils einer gleichbleibend definierten Menge an Hirudin und der anschließenden Bestimmung der Hemmaktivität dieser Lösungen im Chromozym TH-Test II mittels jeweils derselben, im Testansatz vorgelegten Thrombinmenge. Im Serum enthaltene, gegen Hirudin gerichtete Antikörper reagieren bei der Vorinkubation mit dem zugegebenen Hirudin (zum Antigen-Antikörper-Komplex), so daß dieses nicht mehr für die Thrombinhemmung im Chromozym TH-Test II zur Verfügung steht. Aus der Konstanz der Thrombinaktivität bzw. aus der zunehmenden Thrombinhemmung bei steigender Serumverdünnung läßt sich dann eine Antikörpertiterbestimmung durchführen. Das allmähliche Ansteigen der Thrombinhemmung mit zunehmender Serumverdünnung kommt dadurch zustande, daß mit abnehmender Antikörperkonzentration, d.h. abnehmender Menge an gebundenem Hirudin, wieder vermehrt freies Hirudin für die Hemmung des Thrombins zur Verfügung steht.

Durchgeführte Kontrollen und deren Erklärung

Thrombin wird mit steigender Hirudinmenge in kontinuierlich zunehmendem Maße gehemmt.
Der Thrombinleerwert bleibt bei Zugabe von h i t z e b e h a n d e l t e m Meerschweinchen-Kontrollserum (56°C, 30 min) unverändert konstant, da die natürlichen Thrombinhemm-

stoffe (z.B. Antithrombin III) sowie auch eine eventuelle Thrombinaktivität des Serums durch die Erwärmung inaktiviert werden.

Bei kontinuierlicher Zugabe von a k t i v e m Meerschweinchen-Kontrollserum kommt es zu einer Abnahme der Thrombinaktivität, deren Abfall mit steigender Serummenge langsamer wird. Hierbei kommen die natürlichen Thrombininhibitoren zur Wirkung.

Setzt man a k t i v e s Meerschweinchen-Kontrollserum in einer 2er-Schritt-Verdünnungsreihe in das Testsystem ein, so nimmt die Thrombinaktivität mit steigender Verdünnung rasch zu, bis bei der Serumverdünnung von 1:16 das Niveau des Thrombinleerwertes erreicht ist, das sich mit höherer Serumverdünnung dann nicht mehr ändert (s. Abb. 13). Der anfänglich rasche Aktivitätsabfall bei dem unverdünnten Serum ist durch die natürlichen Thrombininhibitoren bedingt, s.o. Mit steigender Serumverdünnung kommt es nun zu einer Konzentrationsabnahme von Antithrombin III etc. im Testsystem und damit zu einem Wiederanstieg der Thrombinaktivität. Bei der Serumverdünnung 1:16 sind die natürlichen Thrombinhemmstoffe aufgrund ihrer geringen Konzentration im Testsystem praktisch nicht mehr wirksam. Die Thrombinaktivität erreicht deshalb wieder den Ausgangswert und bleibt bei Zusatz noch stärker verdünnter Seren unverändert hoch.

I n a k t i v i e r t e s Meerschweinchen-Kontrollserum wurde nach diesem Schema nicht getestet, da anzunehmen ist, daß auch bei Einsatz von Serumverdünnungen der Thrombinleerwert analog wie beim Serumkonzentrat (s.o.) nicht verändert werden wird; die natürlichen Thrombinhemmstoffe wurden ja durch die Hitzebehandlung inaktiviert, s.o.

Versetzt man die 2er-Schritt-Verdünnungen von aktivem und hitzeinaktiviertem Meerschweinchen-Kontrollserum jeweils mit der

gleichen Menge Hirudin, so erfolgt wiederum ein kontinuierlicher Abfall der Thrombinaktivität, beim aktiven Serum noch rascher und ausgeprägter als ohne Hirudinzusatz (s. D.6). Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich im aktiven Serum die Hemmwirkungen von Antithrombin III und Hirudin addierten. Mit steigender Serumverdünnung nimmt die Thrombinhemmaktivät dann nur noch geringfügig zu, da sie dann ausschließlich auf die Wirkung des in jeweils konstanter Menge zugegebenen Hirudins zurückzuführen ist. Daß dieser ausschließlich durch Hirudin bedingte Endhemmgrad beim hitzeinaktivierten Serum nicht bereits beim unverdünnten Serum erreicht wird, ist eventuell auf eine Störung der Komplexbildung zwischen Thrombin und Hirudin durch denaturierte Proteine dieses Serums zurückzuführen. Entsprechend der zugegebenen Hirudinmenge (100 µl) pendeln sich die Thrombinaktivitätswerte für beide Seren bei einer Verdünnung von 1:8 auf ein ΔE/min von ca. 10 ein (s. Abb. 11 und 14).

Nachweis und Titer der spezifischen Antikörper in Seren

Unsere Überlegung war nun, daß es bei Vorhandensein von spezifischen Hirudinantikörpern in Seren intraperitoneal immunisierter Meerschweinchen zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion kommen müßte, wodurch das Hirudin hinsichtlich seiner Hemmaktivität blockiert werden würde. Entsprechend wäre dann der Hirudinbedingte Abfall der Thrombinaktivität aufgehoben.

Tatsächlich kam es mit den verschiedenen Meerschweinchenseren zum erwarteten Verlauf der Thrombinaktivität. Für die Seren Nr. 231, 241 und 285 wurde nach 1stündiger Inkubation mit Hirudin ein Wiederanstieg der Thrombinaktivität mit Ausbildung eines Aktivitätsplateaus gefunden (Abb. 16); nach 5 min langer Inkubation war der Abfall der Thrombinaktivität demgegenüber verzögert und der Wiederanstieg der Aktivität von geringerem Ausmaß (Abb. 15).

Die in den Meerschweinchenseren befindlichen spezifischen Antikörper komplexierten offensichtlich mit dem Hirudin, das danach nicht mehr für die Thrombinhemmung zur Verfügung stand. Solange die Antikörperkonzentration in der Serumverdünnung zur Bindung des Hirudins ausreichte, kam es zur "Schulterbildung". Damit ergab sich auch die Möglichkeit einer Titerbestimmung:

1:32 für Serum Nr. 231
1:32 für Serum Nr. 241
1:16 für Serum Nr. 285

Mit abnehmender Antikörperkonzentration wurde auch weniger Hirudin gebunden, das dann wieder zur Thrombinhemmung zur Verfügung stand. Bemerkenswert ist dabei der sehr langsame Abfall der Thrombinaktivität (s. Abb. 16), der der allmählichen Abnahme der Antikörperkonzentration in den Serumverdünnungen entspricht.

Der unterschiedliche Kurvenverlauf für die beiden Inkubationszeiten (1 Std. und 5 min) ist durch eine noch unvollständige Komplexierung von Antigen und Antikörper innerhalb von 5 Minuten erklärbar. Größere Anteile des Hirudins liegen nach 5 min noch in freier Form vor und sind somit auch noch zur Thrombinhemmung befähigt. Deshalb beobachtet man mit diesen Seren einen gegenüber den Kurvenverläufen nach 1 std. Inkubation verzögerten Aktivitätsabfall bzw. z.T. kommt es sogar zu einem geringen Wiederanstieg der Thrombinaktivität (s. Abb. 15).

Der Frage, ob bei noch längerer Inkubation die Plateaus der Aktivitätskurven über noch weitere Serumverdünnungsschritte erhalten geblieben wären, wurde wegen Serummangels nicht nachgegangen.

Mit Serum Nr. 362 wurde bei 1std. Inkubation kein Plateau erreicht. Es erfolgte jedoch ein sehr verzögerter Abfall der Thrombinaktivität. Das Serum enthielt somit nur eine geringe Hirudinantikörperkonzentration.

Der Serumpool, bestehend aus den Resten von 7 Meerschweinchenseren, erreichte schon bei 5minütiger Inkubation ein Aktivitätsplateau (Serumverdünnung 1:8; Abb. 15). Bei der nächsten Serumverdünnungsstufe fiel die Thrombinaktivität dann bereits auf nahezu Null ab. Der Pool besaß somit wahrscheinlich die höchste Antikörperkonzentration aller getesteten Seren, da er schon nach 5 Minuten langer Inkubation mit Hirudin das Thrombinaktivitätsplateau erreicht hatte. Der abrupte Abfall der Thrombinaktivität zwischen der 1:8 und 1:16 Verdünnung ist eventuell eine Folge der kurzen Inkubationsdauer. Ab einer bestimmten Antikörperkonzentration ist die 5minütige Inkubation zur Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes sicherlich nicht mehr ausreichend; je verdünnter die Reaktionspartner vorliegen, desto mehr Zeit wird benötigt, bis das Gleichgewicht bei der Komplexbildung erreicht ist. Das Poolserum hätte vermutlich nach 1stündiger Inkubation mit Hirudin ein sehr lang gezogenes, über viele Serumverdünnungsschritte reichendes Thrombinaktivitätsplateau bewirkt.

Serum Nr. 284 verursachte den raschesten Abfall der Thrombinaktivität sowohl nach 1std. als auch nach 5minütiger Inkubation mit Hirudin. Dieses Serum enthielt demnach keine nachweisbaren Mengen an hirudinspezifischen Antikörpern.

Art der gebildeten Antikörper

Es stellt sich nun die Frage, welcher Antikörpertyp bei den durchgeführten Immunisierungen primär gebildet wurde, IgG oder IgE. Vergleicht man dazu die Ergebnisse von DHT, PCA und Chromozym TH-Test II hinsichtlich der Hirudinantikörper (s. Tabelle 46), so ergibt sich zunächst ein recht widersprüchliches Bild.
Für die Komplexbildung mit Hirudin im Chromozym TH-Test II scheinen hauptsächlich IgG-Antikörper verantwortlich zu sein, da diese primär zur Bildung stabiler Komplexe bei hoher Verdünnung befähigt sind. Es ist deshalb möglich, daß die unter-

schiedlichen Ergebnisse auf das Vorhandensein von IgG- bzw. IgE-Antikörpern zurückzuführen sind. So ist das Serum bzw. Meerschweinchen Nr. 284 positiv bei DHT und PCA, aber negativ beim Chromozym TH-Test II. Dieser Befund spräche unter der Annahme, daß IgE-Antikörper Komplexe mit dem Antigen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht bilden dafür, daß dieses Meerschweinchen praktisch ausschließlich Hirudin-spezifische IgE-Antikörper synthetisiert hat. Das Tier Nr. 362 hätte dann nur zu einem sehr geringen Anteil IgG-Antikörper gebildet. Die Meerschweinchen Nr. 231, 241 und 285, für die der Chromozym TH-Test II hohe Hirudinantikörperkonzentrationen ergab, hätten anteilsmäßig mehr IgG-Antikörper als die anderen Tiere synthetisiert. Eine genauere prozentuale Aufteilung läßt sich jedoch nicht durchführen.

E.7 Zu den Immundiffusionstechniken

Bei der Rocket-Immunelektrophorese (s. Tabelle 47) bildeten die 4 Leerwerturine (Kontrollen) mit allen 3 Antikörpergelen (Anti-Blutegelrohextrakt, Anti-Hirudin, Anti-Eglin) keine Präzipitatbögen. Die 2 Hirudin bekannter Aktivität enthaltenden Urine reagierten dagegen mit der Ausbildung ausgeprägter spezifischer Präzipitatbögen auf den Anti-Blutegelrohextrakt und Anti-Hirudin enthaltenden Gelen.

Der Urin des gefütterten Meerschweinchens reagierte negativ, die Urine der beiden geschmierten Tiere der Gruppe B dagegen positiv auf allen 3 genannten Antikörpergelen. Quantitative Angaben lassen sich, wie bereits ausgeführt (s. D.7.1), nicht machen.

Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Urine der g e s c h m i e r t e n Meerschweinchen jeweils Bestandteile des Blutegelrohextraktes sowie Hirudin und Eglin enthielten. Die Wirkstoffe müs-

sen somit percutan resorbiert worden sein, da sie andernfalls nicht in den Urin hätten gelangen können; der percutane Resorptionsnachweis für Bestandteile des Blutegelrohextraktes ist somit gegeben.
Dieser Befund wird noch dadurch unterstützt, daß der Urin des gefütterten Meerschweinchens mit allen 3 Antikörpergelen negativ reagierte. Die Blutegelrohextraktbestandteile waren somit nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert worden. Dies ist mit Beobachtungen im Einklang, daß Hirudin durch Trypsin zu 100 % und durch Pepsin zu 80 % zerstört wird (MARKWARDT 1963); auch Eglin wird im pH-Optimun des Trypsins proteolytisch abgebaut (SEEMÜLLER 1979).

Alle bereits genannten Urine (4 Kontrollurine, 2 Hirudin enthaltende Urine, der Urin eines gefütterten Meerschweinchens und 2 Urine geschmierter Tiere) ergaben bei der Radialen Immundiffusion gegen H i r u d i n a n t i k ö r p e r das gleiche Ergebnis wie die Rocket-Immunelektrophorese (s. Tabelle 48). Damit war der Resorptionsnachweis mit einer ähnlichen Technik zumindest qualitativ reproduzierbar.

In einer weiteren Testreihe reagierten alle 4 Urine der geschmierten Meerschweinchen der Gruppe O (zusammenlebende Tiere) unabhängig von der Vorbehandlung (o.S., S.gr., 500 ATE/100 g, 20 000 ATE/40 g) positiv gegenüber Anti-Blutegelrohextrakt und/oder Anti-Hirudin, teilweise sogar bis zur Verdünnung 1:10 (s. Tabelle 49). Auch diese Meerschweinchen müssen die getesteten Substanzen percutan resorbiert haben.

Interessant ist dabei noch die Übereinstimmung der Ergebnisse des DHTs mit der der Mancini-Technik für die ohne Salbe und mit Salbengrundlage behandelten Tiere: beide Meerschweinchen waren im DHT für Hirudin positiv, ihre Urine zeigten bei der Radialen Immundiffusion ebenfalls eine positive Reaktion. Letzteres ist ein weiterer überzeugender Hinweis dafür, daß die Meerschweinchen die Blutegelwirkstoffe allein beim engen

Zusammensitzen durch die Übertragung von Haut zu Haut percutan aufgenommen und sogar noch in meßbarer Konzentration in den Urin ausgeschieden haben.

E.8 Abschließende Diskussion

Das Problem des Nachweises der Resorption von Substanzen durch die intakte Haut besteht hauptsächlich darin, meßbare Plasma- bzw. Urinspiegel des aufgenommenen Stoffes zu erhalten. Dies ist um so schwieriger, je kleiner die Fläche ist, auf die die Präparate lokal aufgetragen werden, da erst nach Verteilung der resorbierten Bestandteile auf die einzelnen Kompartimente meßbare Blut- und Urinspiegel erreicht werden, die dann naturgemäß extrem niedrig sind.

Dieses Problem wurde von uns dadurch umgangen, daß wir bei den Meerschweinchen sehr großflächige Hautareale (ca. 60 % der Körperoberfläche) einschmierten und z.T. relativ hohe Dosen an Hirudinhemmaktivität applizierten (z.B. bei Gruppe H).

Auf der anderen Seite sollte ein lokal anzuwendendes Medikament zwar die einzelnen Hautschichten gut penetrieren, jedoch nicht zu rasch von tiefer liegenden Kompartimenten des Organismus aufgenommen und verstoffwechselt werden (WAHLBERG 1973).
Aufgrund der sehr niedrigen zu erwartenden Blut- bzw. Urinspiegel wurden Testsysteme eingesetzt, die z.T. einen empfindlicheren Nachweis ermöglichen als z.B. Radioimmunoassays (DHT, PCA).

Die nächste grundsätzliche Frage, die wir uns stellen mußten, war die nach der prinzipiellen percutanen Resorbierbarkeit von

Proteinen oder Polypeptiden. SCHEUPLEIN (1987b) belegte die percutane Resorption der Polypeptidantibiotika Gramacidin D (MG ~2 000), Bacitracin (MG ~1 411) und Polymyxin B (MG ~ 1 204). TREGEAR (1966b) wies sogar die percutane Resorption von Albumin (MG 60 500) nach.Ob dies eventuell mit dem hohen Albumingehalt der Haut zusammenhängt (HITZIG 1977), ist nicht bekannt. Wenn jedoch Albumin mit einem Molekulargewicht von ~60 500 die Haut zu penetrieren vermag, so müßte dies den Blutegelwirkstoffen von der Molekülgröße her gesehen (MG 5 000 - 8 000) auch möglich sein.

Der Nachweis der percutanen Resorption von Blutegelwirkstoffen wurde von uns auf zweierlei Weise geführt: einmal indirekt über den Nachweis von gegen Blutegelbestandteile gerichteten Antikörpern (DHT, PCA), welche die Meerschweinchen im Verlaufe der Schmierung gebildet hatten. Zum anderen konnten jedoch auch Blutegelwirkstoffe in freier Form im Serum geschmierter Tiere direkt nachgewiesen werden (DHT). Der Nachweis von Hirudin, Eglin und anderen Blutegelwirkstoffen im Urin geschmierter Meerschweinchen gelang ebenfalls (Rocket-Immunelektrophorese, Mancini-Technik).

Zu den direkten Nachweisen muß jedoch einschränkend gesagt werden, daß es sich jeweils nur um einmalig durchgeführte Versuche handelte, die jedoch übereinstimmende Hinweise für eine percutane Resorption ergaben.

Ob die Blutegelwirkstoffe dabei intakt oder als Bruchstücke mit intakter antigener Determinante resorbiert wurden, ist nicht abgeklärt worden. Aufgrund der relativ kleinen Molekülmasse von Hirudin, Eglin b und Bdellin B ist letzteres jedoch unwahrscheinlich, da auch ein geringfügiger Abbau dieser Moleküle außer ihrer Hemmaktivität auch ihre immunologische Reaktivität zerstören dürfte.

Bisherige Resorptionsstudien mit Blutegelwirkstoffen wurden mit der Resorptionskammer der Firma Sartorius an der Bauchhaut

des Hausschweines durchgeführt. Die beiden uns bekannten Studien beschäftigen sich mit der Penetration der Blutegelrohextraktbestandteile, insbesondere des Hirudins. Sie kommen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß Hirudin sowohl aus wässrigen Lösungen als auch als Salbenpräparationen heraus die Schweinehaut penetriert (MÜLLER H.-P. und MÜLLER B.W. 1980; GASTEIGER: in Vorbereitung).

Damit ergeben sich aus in-vitro Studien an der Schweinehaut und in-vivo Versuchen an Meerschweinchen übereinstimmende Befunde: Blutegelwirkstoffe werden percutan resorbiert.

Inwieweit nun eine percutane Resorption von Blutegelwirkstoffen auch beim Menschen stattfindet, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Da jedoch Schweine- und Meerschweinchenhaut der menschlichen ähnlich sind (CHRISTOPHERS 1981; BARTEK et al. 1972), läßt sich vermuten, daß die Blutegelwirkstoffe von der menschlichen Haut ebenfalls resorbiert werden. Dies dürfte dann umso wahrscheinlicher sein, wenn infolge eines Hämatoms oder einer lokalen Entzündung, also bei Indikationen für die Exhirudsalbe, die Haut mit Sicherheit durchlässiger ist als im Normalzustand. Diesbezügliche Tierversuche an der "kranken" Haut stehen ebenfalls noch aus.

Aufgrund der geschilderten Resultate läßt sich die nicht belegte Behauptung von WALSMANN und MARKWARDT (1981) nicht länger aufrecht erhalten, daß Hirudin percutan nicht resorbiert wird.

Normalerweise besitzen Moleküle mit einer Molekülmasse unter 10 000 Dalton nur eine geringe immunogene Potenz. Von wenigen erklärbaren Ausnahmen abgesehen, haben jedoch alle behandelten Meerschweinchen (geschmiert, gefüttert, intraperitoneal immunisiert) gegen Hirudin, Eglin b und/oder Bdellin B Antikörper gebildet (s. DHT, PCA, Chromozym TH-Test II). Steigende Antikörpertiter fanden sich dabei in der Reihenfolge: oral gefüttert < geschmiert < intraperitoneal injiziert.

Die Meerschweinchen erhielten die Inhibitoren in Form des vorgereinigten Blutegelrohextraktes entweder als Salbenpräparation oder als Lösung appliziert. Der Blutegelrohextrakt enthielt außer Hirudin, Eglinen und Bdellinen wahrscheinlich auch noch andere Begleitproteine. Inwieweit diese die immunogene Potenz der genannten Inhibitoren beeinflußten, entzieht sich unserer Kenntnis, ebenso deren Resorbierbarkeit. Es ist jedoch denkbar, daß die genannten Inhibitoren an solche Begleitsubstanzen im Blutegelrohextrakt assoziiert sind, sodaß sie als Haptene bei der Stimulierung der Antikörperproduktion fungierten. Dies würde jedoch andererseits bedeuten, daß die Inhibitoren in nicht assoziierter Form die Haut noch besser zu penetrieren vermögen, da ihre effektive Molekülmasse dann entsprechend kleiner ist.

MARKWARDT (1963) gibt an, daß bei wiederholter intravenöser und subcutaner Injektion von reinem Hirudin an Kaninchen keine Sensibilisierung aufgetreten sei. Er macht dazu keine näheren Angaben. Beim Meerschweinchen wirkt der Blutegelrohextrakt jedoch sensibilisierend bzw. immunogen und zwar bei entsprechender oraler, topisch lokaler oder intravenöser Applikation. Daraus kann aber noch nicht auf die immunogene Potenz der Reinsubstanzen Hirudin, Eglin und Bdellin geschlossen werden, da unter Umständen im Rohextrakt vorhandene Begleitsubstanzen die Immunogenität der Inhibitoren verstärkten, s.o.

Ziel dieser Studie war es, die Möglichkeit der percutanen Resorption von Blutegelwirkstoffen mit Miniprotein- bzw. Polypeptidcharakter aufzuzeigen. Die dabei erzielten Resultate können als Orientierungshilfe für umfassendere Untersuchungen dieser Art sowie für entsprechende klinische Studien dienen.

F ZUSAMMENFASSUNG

Meine Arbeit hatte das Ziel, am Tiermodell den Nachweis der Resorption von in Blutegeln enthaltenen Proteinaseinhibitoren (Blutegelwirkstoffen) aus Salben durch die intakte Haut zu erbringen. Im Mittelpunkt unseres Interesses stand dabei das Verhalten von Hirudin, einem Miniprotein mit einer Molekülmasse von ca. 7 000 und ausgeprägter gerinnungshemmender Aktivität. Das Resorptionsverhalten von Eglin b, einem Elastase-Chymotrypsin-Inhibitor ($M_r \sim 8\ 000$) und von Bdellin B, einem Trypsin-Plasmin-Inhibitor ($M_r \sim 4\ 800$), wurde ergänzend mituntersucht.

Der Resorptionsnachweis sollte unter anderem über die percutane Induktion von Antikörpern gegen Hirudin, Eglin b und Bdellin B geführt werden.

Meerschweinchen wurden mit unterschiedlichen, Blutegelrohextrakt enthaltenden Präparationen (Salben, Lösungen) auf verschiedene Weise immunisiert (Schmierung, Fütterung, intraperitoneale Injektion). Der Nachweis von spezifischen Antikörpern erfolgte durch den Direkten Hauttest (DHT), die Passive Cutane Anaphylaxie (PCA) und den Chromozym TH-Test II, der Nachweis von freien Blutegelwirkstoffen im Serum durch den DHT an intraperitoneal immunisierten Tieren. Zum Nachweis der Proteinaseinhibitoren in den Urinen wurden auch die Rocket-Immunelektrophorese sowie die Radiale Immundiffusion nach Mancini eingesetzt.

Bei praktisch allen der mit Blutegelextrakt enthaltenden Salben wiederholt geschmierten Meerschweinchen konnten Antikörper gegen Hirudin, Eglin b und/oder Bdellin B mittels des DHTs und z.T. zusätzlich mit Hilfe der PCA-Reaktion nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze im DHT lag für Hirudin bei 10 pg/0,1 ml.

Der Nachweis von freien Blutegelwirkstoffen in Meerschweinchenseren konnte ebenfalls geführt werden. Es besteht eine Zeitabhängigkeit der Penetration mit einem Resorptionsmaximum bei ca. 70 Minuten nach Schmierung.

Mittels der Immundiffusionstechniken gelang es, bei geschmierten Meerschweinchen die Blutegelwirkstoffe Hirudin und/oder Eglin (bzw. Bruchstücke mit den antigenen Determinanten davon) auch im Urin nachzuweisen.

Nahezu alle gefütterten (Salbe, Lösung) Meerschweinchen bildeten Antikörper gegen Hirudin, Eglin b und/oder Bdellin B, allerdings nur bis zu einer unteren Nachweisgrenze im DHT für Hirudin von 20 µg/0,1 ml. Die Plaquedurchmesser im DHT waren hier für alle 3 Inhibitoren wesentlich kleiner als bei den geschmierten Tieren.

Die intraperitoneal immunisierten Meerschweinchen wiesen für alle 3 getesteten Inhibitoren die höchsten Antikörpertiter und die ausgeprägtesten Plaquereaktionen auf: Im DHT lag die Nachweisgrenze für Hirudin bei 2 pg/0,1 ml, für Eglin b bei 640 ng/0,1 ml und für Bdellin B bei 1,6 µg/0,1 ml. Von den Seren derselben Meerschweinchen wurden auch die PCA-Titer bestimmt. Der maximale Titer betrug für alle 3 Inhibitoren 1:256. Von den gleichen Seren wurden mittels des Chromozym TH-Tests auch die Spiegel der spezifischen Hirudinantikörper ermittelt. Der maximale Titer lag bei 1:32.

Der Nachweis der Resorption von Proteinaseinhibitoren aus Blutegelwirkstoffe enthaltenden Salben durch die intakte Meerschweinchenhaut ist somit durch die percutan stimulierte Antikörperbildung und das Vorhandensein der Blutegelwirkstoffe in Serum und Urin gegeben.

Das Ausmaß der Antikörperbildung bei den Meerschweinchen war von der Art der Zufuhr des Antigens abhängig. Es fanden sich

steigende Antikörpertiter in der Reihenfolge: orale Zufuhr < geschmierte Tiere < intraperitoneal immunisierte Tiere. Die Antikörpertiter für Hirudin bei gefütterten Meerschweinchen waren dabei minimal.

Normalerweise sind Proteine mit einer Molmasse unter 10 000 Dalton nur schwach immunogen. Die Meerschweinchen wurden in allen Fällen mit Blutegelrohextrakt immunisiert. Die Möglichkeit, daß andere im Blutegelrohextrakt vorhandene Substanzen die Antikörperproduktion verstärkten, ist damit gegeben. Es kann folglich aus diesen Versuchsergebnissen nicht auf die immunogene Potenz bzw. allergene Wirksamkeit der einzelnen, reinen Inhibitoren geschlossen werden.

Insgesamt stellen die Ergebnisse der vorliegenden Studie somit eine Orientierungshilfe für umfassende Untersuchungen dieser Art sowie für entsprechende klinische Studien dar.

G LITERATURVERZEICHNIS

ACKERKNECHT E.: Kurze Geschichte der Medizin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1975)

BARTEK M.J., LA BUDDE A.J., MAIBACH H.I.: Skin permeability in vivo: Comparison in rat, rabbit, pig and man. The Journal of Investigative Dermatology, Vol. 58, No. 3, 114-123, USA (1972)

BARTHELS M., POLIWODA H.: Gerinnungsanalysen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1980)

BECK G., HAMMER K., SCHEUBER H.P.: Untersuchungen zur Herstellung hochspezifischer polyvalenter diagnostischer Antitoxine. Zwischenbericht 1.05.1979-30.04.1980 zum Forschungsvorhaben In San I - 0475 - V - 043 (1980)

BENDIXEN G.: The atopic state. in: Steffen C., Ludwig H.: Clinical Immunology and Allergology. Developments in Immunology Vol. 14, Elsevier/North Holl. Biomed. Press, Amsterdam, 323-330 (1981)

BENNICH H., JOHANSSON S.G.O., v.BAHR-LINDSTRÖM H., KARLSSON T.: in: Johannson S.G.O., Strandberg K., Uvnäs B. (Eds.): Molecular and biological aspects of the acute allergic reaction. Plenum Press, New York, 175 (1976)

BIER O.G., GÖTZE D.: 4. Antibodies. in: Bier O.G., Dias da Silva W., Götze D., Mota I.: Fundamentals of Immunology. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 69-110 (1981)

BOTTENBERG H.: Die Blutegelbehandlung. Hippokrates Verlag, Stuttgart (1935)

BRANDIS F.T., ROTHE H.: Behandlungsmöglichkeiten mit Exhirud, einem Nativ-Blutegelvollsekret-Präparat. Therapie der Gegenwart, 96, Sonderdruck aus Heft 2 (1957)

BRANDIS H.: Einführung in die Immunologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1975)

BRATTIG N., SCHUFF-WERNER P., BERG P.A., NAGEL G.A.: Immunsuppressive Faktoren im Serum von Tumorkranken. Die gelben Hefte, 21. Jg., Heft 4, 149-156 (1981)

CHRISTOPHERS E.: Der Keratinozyt: Formale Genese und Struktur. in: Klaschka F. (Hrsg.): Stratum Corneum - Struktur und Funktion, Grosse Verlag, Berlin 50-55 (1981)

CONRAD D.H., BAZIN H., SEHON A.H., FROESE A.: Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors. J. Immunol., 114, 1688 (1975)

COOMBS R.R.A., GELL P.G.H.: The classification of allergic reactions underlying disease. in: Gell P.G.H., Coombs R.R.A.: Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 317 (1963)

CUNNINGHAM-RUNDLES C.: Humoral immunity in comprehensive immunology. in: Safai B., Good R.A.: Immunodermatology 7. Plenum Medical Book Company, New York, 47-63 (1981)

DAVIE E.W., FUJIKAWA K., KURACHI K., KISIEL W.: The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. in: Meister A.: Advances in Enzymology, Vol. 48, John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto, 277 (1979)

DEUSER E.: Über Behandlungsmethoden von Distorsionen, Kontusionen und Hämatomen im Sportgeschehen. Sportarzt und Sportmedizin, 22, 112-113 (1971)

DUCKERT F.: Die Anwendung chromogener Substrate in der Gerinnungsanalytik. Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (1976)

EHRLICH P.: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. Arch. Anat. Physiol., 3, 166 (1879)

FELDMANN R.J., MAIBACH H.I.: Regional variation in percutaneous penetration of ^{14}C cortisone in man. J. Invest. Derm., 48, 181 (1967)

FRITZ H., GEBHARDT M., MEISTER R., FINK E.: Trypsin-plasmin inhibitors from leeches. Isolation, amino acid composition, inhibitory characteristics. in: Fritz H., Tschesche H.: Proceedings of the 1st international research conference on proteinase inhibitors. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 271-293 (1971)

FRITZ H., SCHLEUNING W.-D., SCHILL W.-B.: Biochemistry and clinical significance of the trypsin-like proteinase acrosin from boar and human spermatozao. in: Fritz H., Tschesche H., Greene L.J., Truscheit E.: "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 118-127 (1974)

GALLY J.: Structure of Immunoglobulins. in: Sela M.: The Antigens, Volume 1. Academic Press, New York and London, 161-298 (1973)

GEIGER R., STUCKSTEDTE U., FRITZ H.: Isolation and characterization of human urinary kallikrein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd. 361, 1003-1016 (1980)

GERSHWIN L.J.: Heterologous passive cutaneous anaphylaxis with bovine immunoglobulin E. Am. J. Vet. Res., Vol. 42, No. 7, 1184-1187 (1981)

GLENNER G.G., COHEN L.A.: Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. Nature 185, 846-847 (1960)

GLENNER G.G., HOPSU V.K., COHEN L.A.: Histochemical demonstration of a trypsin-like esterase activity in mast cells. J. Histochem. Cytochem., 10, 109-110 (1962)

GOLLNICK N.: Zur Behandlung des Status varicosus. Med. Welt, 32, 2417-2420 (1963)

GREAVES M.F., STANSFELD A.G., HABESHAW J.A.: 9. Lymphocytes. in: Zucker-Franklin D., Greaves M.F., Grossi C.E., Marmont A. M.: Atlas of Blood Cells, Vol. 2. Edi. Ermes, Milano, Lea & Febiger, Philadelphia, 409-525 (1981)

HABERLAND G.L.: Immunological behaviour of proteolytic enzyme inhibitors. in: Synthetic and natural proteinase inhibitors: Basic and clinical aspects. Internat. Symp. in Tokyo, Nov. 20th 1967, Japanese Society of Medical Sciences, Tokyo, 47-55 (1967)

HABERMANN E.: Gefäßaktive Peptide und Proteine. in: Roka L.: Generalisierte intravasculäre Gerinnung. Beinflußung der Hämostase durch gefäßaktive Pharmaka. Schattauer, Stuttgart-New York, 193-213 (1971)

HARPER H.A., LÖFFLER G., PETRIDES P.E., WEISS L.: Physiologische Chemie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, (1975)

HAYCRAFT J.B.: On the action of a secretion obtained from the medical leech on the coagulation of the blood. Proc. Roy. Soc., London, Bd. 36, 478-487 (1884)

HEIDENHAIN R.: Versuche und Fragen zur Lehre von der Lymphbildung. E. Pflüger, Archiv für Physiol., Bd. 49, 209-301 (1891)

HERTER K.: Der medizinische Blutegel und seine Verwandten. in: Die Neue Brehm-Bücherei Nr. 381. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt (1968)

HITZIG W.H.: Plasmaproteine. Pathophysiologie und Klinik. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1977)

HSÜ L.S.Y., HSÜ H.F., PENICK G.D., HANSON H.O., SCHILLER H.J., CHENG H.F.: Immunoglobulin E, mast cells, and eosinophils in the skin of rhesus monkeys immunized with X-irradiated cercariae of Schistosoma japonicum. Int. Archs Allergy appl. Immun., 59, 383-393 (1979)

ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., HORNBROOK M.M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. J. Immunol., 97, 75-85 (1966)

ISHIZAKA K., TOMIOKA H., ISHIZAKA T.: Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes. J. Immunol. 105 II, 1459-1467 (1970)

ISHIZAKA K.: Chemistry and biology of immunoglobulin E. in: Sela M.: The Antigens, Vol. I. Academic Press, New York and London, 479-528 (1973)

ISHIZAKA T., SOTO C., ISHIZAKA K.: Mechanisms of passive sensitization. III. Number of IgE molecules and its receptor sites on human basophil granulocytes. J. Immunol., 111, 500 (1973)

JAKOBJ C.: 5. Über Hirudin. Dtsch. med. W.schr., 30, 1786-1787 (1904)

JOHNSON J.R.: Treatise on the medical leech. Edinbourgh (1816)

KARLSON P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

KLÖSS T., LORENZ W., MEYER U., MITTMANN U., NEUGEBAUER E., SAGGAN W.W.: Gerinnungshemmung durch selektive Thrombinblockade mit Hirudin. Langenbecks Arch. Chirurgie, Suppl. 1978, 143 (1978)

KÖNIG W.: Der IgE-Rezeptor. in: New trends in allergy. FdM-Schriftenreihe für praktische Medizin 1980/I, Fortschritte der Medizin, MB Schwappach & Co., Gauting, 9 (1980)

KÖSTERING H., KÖNIG F., KOSITZKI H., RIESENKAMP W., HAUNSCHILD N.: Thrombenbehandlung durch Hirudin. Untersuchungen über die Wirkung der Exhirud^{R}-Blutegelsalbe auf gleichstrominduzierte Thromben in der Ohrvene der Maus. Der Praktische Arzt, 20.Jg., Sonderdruck aus Heft 9, 1-8 (1973)

KOOTEN W.J. van, MALI J.W.H.: The significance of sweat-ducts in permeation experiments on isolated cadaverous human skin. Dermatologica, Basel 132, 141-151 (1966)

KOZARICH J.W., STROMINGER J.L.: A membrane enzyme from staphylococcus aureus which catalyzes transpeptidase, carboxypeptidase and penicillinase activity. The Journal of Biological Chemistry, 253, No. 4, 1272-1278 (1978)

KREJCI K., FRITZ H.: Structural homology of a trypsin-plasmin inhibitor from leeches (Bdellin B-3) with secretory trypsin inhibitors from mammals. Febs Letters, 64, 152-155 (1976)

KULCZYCKI A., METZGER H.: The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II. Quantitative aspects of the binding reaction. J. Exp. Med., 140, 1676 (1974)

KULCZYCKI A.: Role of immunoglobulin E and immunoglobulin E receptors in bronchial asthma. J. Allergy Cli. Immunol., 68, 5-14 (1981)

LAGUNOFF D., BENDITT E.P., WATTS R.: Histochemical study of esterases homospecific with trypsin. J. Histochem. Cytochem., 10, 672-673 (1962)

LAGUNOFF D., BENDITT E.P.: Proteolytic enzymes of mast cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., 103, 185-197 (1963)

LASKOWSKI M. jr., SEALOCK R.W.: Protein proteinase inhibitors-molecular aspects. in: The Enzymes Vol. III (Ed. Boyer P.D.), Academic Press, New York, 375-473 (1971)

LAURELL C.-B.: Elektroimmuno Assay. The Scandinavian J. of clin. Labor. Investigation, Vol. 29, Suppl. 124, 21 (1972)

LAURELL C.-B.: Relation between structure and biologic function of the protease inhibitors in the extracellular fluids. in: Protides of the biological fluids, 22nd colloquium, Vol. 22 (Ed. Peeters H.), Pergamon Press, Oxford, 3 (1975)

LEVINE B.B., CHANG H. jr., VAZ N.M.: The production of hapten-specific reaginic antibodies in the guinea pig. The J. of Immunol., 106, 29-33 (1971)

LYONS A.S., PETRUCELLI II R.J.: Die Geschichte der Medizin im Spiegel der Kunst. Du Mont Buchverlag, Köln (1980)

MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS I.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2, 235-254 (1965)

MANN K.H.: Leeches (Hirudinea). Their structure, physiology, ecology and embryology. Pergamon Press, Oxford (1962)

MARKWARDT F.: Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften, 42, 537 (1955)

MARKWARDT F.: Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins. Arch. Exp. Path. Pharmakol., 229, 389-399 (1956)

MARKWARDT F., WALSMANN P.: Die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 312, 85 (1958)

MARKWARDT F.: Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren. Fischer Verlag, Jena (1963)

MARKWARDT F., WALSMANN P.: Reindarstellung und Analyse des Thrombininhibitors Hirudin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, 1381-1386 (1967)

MARX R.: Antithrombin III: praktische Bedeutung und neues, therapeutisches Prinzip. Therapiewoche, 31, 4295-4307 (1981)

MATTENHAINER H.: Die Theorie des enzymatischen Tests. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim (1973)

MITTELSTAEDT R.: Weitere klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Wirkung hirudinhaltiger Externa. Arzneimittel-Forschung (Drug Res.), 23, 581-583 (1973)

MORSE I.O.: Alpha$_1$-Antitrypsin-Deficiency Part 1. The new England J. Med., 299, 1045-1048 (1978a)

MORSE I.O.: Alpha$_1$-Antitrypsin-Deficiency Part 2. The New England J. Med., 299, 1099 (1978b)

MOTA I.: Hypersensitivity. in: Bier O.G., Dias da Silva W., Götze D., Mota I.: Fundamentals of immunology. Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 257-296 (1981)

MÜLLER H.-P., MÜLLER B.W.: In vitro-Freisetzung aus flüssigen und halbfesten Arzneiformen unter Verwendung von natürlichen Membranen: II. Untersuchungen von Polypeptiden. Vortrag, Analytisch Pharmazeutische Verfahrenstechnik Jahreskongress 1980, Antwerpen (1980)

NEWBALL H.H., TALAMO R.C., LICHTENSTEIN L.M.: Release of leucocyte kallikrein mediated by IgE. Nature, 254, 635-636 (1975)

OPRÉE W.: Pathogenese atopischer Erkrankungen aus immunologischer Sicht. Verlag Chemie, Weinheim, New York (1979)

ORFANOS C.E.: Aufbau der Hornschicht im Hinblick auf ihre Funktion. in: Klaschka F.: Stratum Corneum - Struktur und Funktion. Grosse Verlag, Berlin, 29-49 (1981)

OVARY Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. in: Ackroyd: Immunological methods. CIOMS symposium, Blackwell, London, 259-283 (1964)

OVARY Z., KAPLAN B., KOJIMA S.: Characteristics of guinea pig IgE. Int. Archs Allergy appl. Immun., 51, 416-428 (1976)

PETERSEN T.E., ROBERTS H.R., SOTTRUP-JENSEN L., MAGNUSSON S.: Primary structure of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. in: Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the 23th Colloquium. Pergamon Press, Oxford-New York, (Peeters H. - Ed.), 145-149 (1976)

PFLEIDERER G., ZWILLING R.: Die molekulare Evolution proteolytischer Enzyme. Naturwissenschaften, 59, 369-405 (1972)

PLANTORGAN WERK KG: Vorschrift zur quantitativen Bestimmung von Hirudin. Laborvorschrift Nr. 301, 301/1-301/5, Bad Zwischenahn (1980)

POLAK L., TURK J.L.: Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide through inhibition of suppressor cell activity. Nature, 249, 654-656 (1974)

PORATH J., UI N.: Chemical studies on immunoglobulins. I. A new preparative procedure for γ-globulins employing glycine rich solvent systems. Biochim. Biophys. Acta, 90, 324-333 (1964)

PRAUSNITZ C., KÜSTNER H.: Studien über die Überempfindlichkeit. Zentralblatt f. Bakteriol., Parasitenk., Infektionskr., I. Abt. Originale, Bd. 86, Heft 2, 160-169 (1921)

PROCTOR R.R., RAPAPORT S.J.: The partial thromboplastintime with Kaolin: a simple screening for first stage plasma clotting factor deficiencies. Amer. J. clin. Path., 36, 212 (1961)

QUICK A.J.: The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. J. biol. Chem., 109, 73 (1935)

REICH E., RIFKIN D.B., SHAW E.: Proteases and biological control. Cold Spring Harbor Laboratoy (1975)

RING J.: Angewandte Allergologie. 4. Folge. Allergiediagnostik: In-vitro-Untersuchungen. Münch. med. Wschr., 123, Nr. 47, SEM 92-98 (1981)

RINGSHAUSEN K.D.: Ein Beitrag zur Behandlung von Erfrierungen. Medizin heute, 12, 398-400 (1963)

ROITT I.M.: Leitfaden der Immunologie. Steinkopff Verlag, Darmstadt (1977)

ROMEIS B.: Mikroskopische Technik. Oldenbourg Verlag, München (1968)

SAWATZKI G.: Praktische Durchführung der Rocket-Immunelektrophorese und Auswertung mit Hilfe eines Laborcomputers. MPI für Biochemie, München, Vortrag, 26.02.1981

SCHAEFER H.: Stratum corneum: Funktion als Grenzmembran. in: Klaschka F.: Stratum Corneum - Struktur und Funktion. Grosse Verlag, Berlin, 56-62 (1981)

SCHEUBER H.-P.: Hemmung der Inaktivierung konjugierter Bakteriophagen als Methode zum empfindlichen Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B. Dissertation Veterinärmedizin, München (1977)

SCHEUBER H.-P., BECK G.: Quantitierung von Botulinus Toxin C in einem aktiv sensibilisierten Meerschweinchen als Methode zum empfindlichen Nachweis von Botulinus Toxin C. Vortrag anläßl. des Kurses zur "Einweisung in die Clostridiendiagnostik" in der Veterinär-Untersuchungsstelle der Bundeswehr I, Kiel, 28.10.-31.10.1980

SCHEUPLEIN R.: The skin as a barrier. in: Jarret A.: The Physiology and Pathophysiology of the skin. Vol. 5. Academic Press, London-New York-San Francisco, 1669-1692 (1978)

SCHEUPLEIN R.: Site variations in diffusion and permeability. in: Jarret A.: The Physiology and Pathophysiology of the skin. Vol. 5. Academic Press, London-New York-San Francisco, 1731-1752 (1978)

SCHILL W.-B.: Die Bedeutung der proteolytischen Spermaenzyme für die Fertilität. Hautarzt, 26, 514-523 (1975)

SCHILL W.-B.: Biochemie und Funktion des Akrosin und seiner Inhibitoren beim Fortpflanzungsvorgang mit besonderer Berücksichtigung der klinischen Bedeutung. in: Schirren C.: Fortschritte der Andrologie. Proteinasen und Proteinaseinhibitoren beim Menschen. Vol. 5. Grosse Verlag, Berlin, 1-44 (1976)

SCHNITZLER S.: Pharmakologische Aspekte von Immunreaktionen. Reihe Wissenschaft, Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig/Wiesbaden (1979)

SCHRAMM W., WUNDERER G., MARX R., FRITZ H.: Low molecular weight inhibitors of fibrinolysis and blood clotting from leeches and sea anemones. in: Seno S., Takaku F., Irino S.: Topics in Hematology. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, 536-540 (1977)

SCHRAMM W.: Antithrombin III-Mangel: klinische Symptome und Möglichkeiten der Therapie. Die gelben Hefte, 21, Heft 1, 1-6 (1981)

SCHWICK G., BRÄUER H.: Exempla immunologica. Bildatlas zu Antikörperreaktionen. Behringwerke, Med. Information, Frankfurt (1980)

SEEMÜLLER U., MEIER M., SHAMS-BORHAN G.: Proteinaseinhibitoren aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis. in: Jahresbericht 1977 - Abt. für Klin. Chemie u. Klin. Biochemie an der Chirurg. Universitätsklinik München, Dissertations- u. Fotodruck Frank oHG, München, 17 (1977a)

SEEMÜLLER U., MEIER M., OHLSSON K., MÜLLER H.-P., FRITZ H.: Isolation and characterisation of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, 1105-1117 (1977b)

SEEMÜLLER U.: Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis mit Hemmwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschlichen Granulozytenproteinasen Elastase und Kathepsin G. Isolierung, Charakterisierung und Studien zum Hemmechanismus. Dissertation, Gaisser + Hirschmann, Freudenstadt (1979)

SEHON A.H., LEE W.Y.: Hyposensibilisierung durch Allergene nach Konjugation an synthetische Polymere. in: New Trends in Allergy. FdM-Schriftenreihe für praktische Medizin 1980/I., Fortschritte der Medizin, MB Schwappach, Gauting, 49 (1980)

SELA M.: Structure and Specifity of Synthetic Polypeptide Antigens. in: Ann. New York Acad. Sci., 169, 23 (1970)

SPIEGELBERG H.: Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. in: Dixon F.I., Kunkel H.G.: Advances in Immunology, Vol. 19, Academic Press, New York-London, 259-294 (1974)

STANWORTH D.R.: Immediate hypersensitivity. The molecular basis of the allergic response. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, London (1973)

STOCK D., DIEZEMANN E., ELL N., GOTTSTEIN J.: Bringt die lokale Blutegelwirkstoffapplikation Vorteile für die Mobilisierung operierter Gelenke? Therapiewoche, 29, 2626-2632 (1979)

STRÜMPER H.-J.: Blutegeltherapie - gestern und heute. Süddt. Apotheker Zeitung, Bd. 103, Heft 44, 1457 (1963)

SULLIVAN A.L., GRIMLEY P.M., METZGER H.: Electron microscopic localization of immunoglobulin E on the surface of human basophils. J. exp. Med., 134, 1403-1416 (1971)

TOMIOKA H., ISHIZAKA K.: Mechanisms of passive sensitization. II. Presence of receptors for IgE on monkey mast cells. J. Immunol., 107, 971-978 (1971)

TREGEAR R.T.: Physical functions of skin. Academic Press, New York (1966a)

TREGEAR R.T.: The permeability of skin to albumin, dextrans and polyvinyl pyrrolidone. J. invest. Derm., 46, 24-27 (1966b)

TRONNIER H.: Weitere experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Hirudin-haltigen Salbe. Der Hautarzt, 20, 114-116 (1969)

TURK J.L.: Research Monographs in Immunology - Volume 1. Delayed Hypersensitivity. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980)

VOGEL R., TRAUTSCHOLD I., WERLE E.: Natural Proteinase Inhibitors. Academic Press, New York-London (1968)

WAHLBERG J.E.: Percutaneous absorption. Curr. Probl. Derm., vol. 5, 1-36 (1973)

WALSMANN P., MARKWARDT F.: Biochemische und pharmakologische Aspekte des Thrombininhibitors Hirudin. Die Pharmazie, 36, 653-660 (1981)

WASSERMAN S.I.: The mast cell and the inflammatory response. in: Pepys J., Edwards A.M.: The mast cell, its role in health and disease. Pitman Medical Publishing Co Ltd. Kent, England, 9-20 (1979)

de WECK A.L.: Suppression of IgE antibodies. in: Steffen C., Ludwig H.: Clinical Immunology and Allergology, Developments in Immunology Vol. 14. Elsevier/North-Holland Biomed Press, Amsterdam, 381-388 (1981)

WERLE E., ZICKGRAF-RÜDEL G.: Natural proteinase inhibitors. Distribution, specifity, mode of action and physiological significance. Z. Klin. Chemie, 10, 139-150 (1972)

WESENER G.: Behandlung der oberflächlichen Thrombophlebitis. Ärztl. Praxis, 17, 1660-1661 (1965)

WESENER G.: Zur Diagnose und Therapie der oberflächlichen Thrombophlebitis(Varicophlebitis) in der Sprechstunde. Zeitschr. f. Haut- und Geschlechtskrankheiten, 22, 61-68 (1967)

WITTE J.: Endotoxinämie und hyperdynamer septischer Schock: Pathobiochemie ausgewählter Gerinnungs- und anderer Plasma-Proteinparameter. Habilitationsschrift, Med. Fakultät der Universität München (1979)

ZESCH A.: Reservoirfunktion der Hornschicht. in: Klaschka F.: Stratum Corneum - Struktur und Funktion. Grosse Verlag, Berlin, 63-76 (1981)

ZETTEL G.: Beobachtungen über Exhirud-Salbe bei der Behandlung der Akne vulgaris. Zeitschr. f. Allgemeinmedizin, 43, 633 (1967)

ZUCKER-FRANKLIN D.: 7. Basophils. in: Zucker-Franklin D., Greaves M.F., Grossi C.E., Marmont A.M.: Atlas of Blood Cells. Function and pathology. Volume 1. E.E. edi. ermes Milano, Lea & Febiger Philadelphia, 287-317 (1981)

LEBENSLAUF

05.05.1954	geboren in Durach (Allgäu) als erstes Kind von Georg Stölzle und Berta Stölzle, geb. Wegscheider
1960-1964	Besuch der Volksschule am Haubenschloß in Kempten
1964-1973	Besuch des Hildegardisgymnasiums in Kempten
08.06.1973	Reifeprüfung
1974-1980	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
23.04.1980	Staatsexamen in Medizin
07.05.1980	Approbation als Ärztin
01.10.1980-31.07.1981	Wissenschaftliche Angestellte an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München - Durchführung der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Fritz
seit 01.08.1981	Assistenzärztin am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses München - Schwabing